

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica



ESTABILIDAD DE LOS PREPARADOS OFICINALES
MINOXIDIL, SULFATO DE COBRE Y EOSINA

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Mario Fernández Román

Bajo la dirección de la doctora

Paloma Ballesteros Papantonakis

Madrid, 2012

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica



ESTABILIDAD DE LOS PREPARADOS OFICINALES

MINOXIDIL, SULFATO DE COBRE Y EOSINA

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Mario Fernández Román

Bajo la dirección de la doctora

Paloma Ballesteros Papantonakis

Madrid

ESTUDIO DE ESTABILIDAD DE LOS PREPARADOS OFICINALES MINOXIDIL, SULFATO DE COBRE Y EOSINA

La presente memoria experimental y bibliográfica presentada para optar al grado de Doctor en Farmacia, elaborada por **D. Mario Fernández Román** ha sido realizada en el Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la U.C.M., bajo la dirección de la **Dra. Dña. Paloma Ballesteros Papantonakis**.

Agradecimientos

Una vez finalizado este trabajo, es el momento de agradecer a todas las personas que han hecho posible la realización del mismo, en especial a:

Mi directora de tesis **Doña Paloma Ballesteros Papantonakis** por aceptarme incondicionalmente como doctorando y ser guía y apoyo en todo momento.

A **Juan José Torrado Durán** por su amabilidad y desprendida generosidad humana y científica durante todo el estudio además de su apoyo en el desarrollo de la técnica de HPLC.

A **Carmen de la Rosa Jorge** por su ayuda inestimable en el desarrollo del estudio microbiológico, sus profundos conocimientos y su simpatía. A **Concepción Pintado García** de igual modo por su apoyo en el desarrollo de la parte de microbiología.

A **José Ramón Quintana Nieto** por su desinteresado apoyo en el manejo del aparato de Absorción Atómica. Al igual que a **Ana de Santiago Martín** y todo el departamento de Edafología.

A **Carmen del Campo Pérez** por abrirme el camino en el departamento de Química Orgánica y a **Loreto Salazar Martínez de Pisón** por su ayuda en el desarrollo de las técnicas de Resonancia Magnética Nuclear e Infrarrojos y sus extensos conocimientos que me han servido para comprender este, muchas veces, hermético mundo de los espectros.

A mis compañeros de departamento de Tecnología Farmacéutica.

A mis compañeros de trabajo por apoyarme durante todo el tiempo que ha durado el estudio.

A mi mujer por su paciencia en estos años y a mis hijos por ser mi fuerza.

Este trabajo está dedicado a la memoria de mi madre y a mi padre que siempre ha confiado en mi capacidad para el trabajo.

INDICE

INTRODUCCIÓN	15
OBJETIVO	19
PLANTEAMIENTO	19
CAPÍTULO I. SOLUCIÓN DE MINOXIDIL AL 2%	21
INTRODUCCIÓN	21
PARTE TEÓRICA	23
1. FARMACOLOGÍA	23
1.1. GRUPO TERAPÉUTICO	23
1.2. ACCIÓN TERAPÉUTICA	23
1.3. MECANISMO DE ACCIÓN	23
1.4. FARMACOCINÉTICA DEL MINOXIDIL POR VÍA TÓPICA	24
1.5. INDICACIONES	25
1.6. POSOLOGÍA	25
1.7. PRECAUCIONES	26
1.8. REACCIONES ADVERSAS	26
1.9. CONTRAINDICACIONES	27
2.0. SOBREDOSIS	27
2.1. TOXICIDAD	27
2.2. INTERACCIONES CON OTROS MEDICAMENTOS	28
2.3. ADVERTENCIAS Y CONSEJOS	28
2. DATOS FÍSICO - QUÍMICOS	29
2.1. N° CAS	29
2.2. ESTRUCTURA QUÍMICA	30
2.3. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS	30

2.4.	ESTABILIDAD Y ALMACENAMIENTO	31
2.5.	REACCIONES DE IDENTIFICACIÓN	31
2.6.	MÉTODOS DE ANÁLISIS	33
2.6.1.	MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS .	33
2.6.2.	MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS	33
PARTE EXPERIMENTAL		35
3.	MATERIALES	35
3.1.	MATERIAS PRIMAS	35
3.2.	CERTIFICADO DE ANÁLISIS	35
3.3.	INSTRUMENTAL DE LABORATORIO	36
3.4.	REACTIVOS	38
4.	MÉTODOS Y RESULTADOS	39
4.1.	CARACTERIZACIÓN DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS	39
4.2.	RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DE LOS CARACTERES ORGANOLÉPTICOS	39
4.3.	VALORACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA UV VALIDACIÓN ANALÍTICA	39
4.4.	RESULTADOS DE LA VALORACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA	41
4.4.1.	LINEALIDAD	41
4.4.2.	SENSIBILIDAD	48
4.4.3.	PRECISIÓN	49
4.4.4.	ROBUSTEZ	50
4.5.	VALORACIÓN POR HPLC	51
4.6.	RESULTADOS HPLC	53
4.7.	ESTUDIO DE ESTABILIDAD DEL	

MINOXIDIL EN SOLUCIÓN	56
4.8. RESULTADOS. GRAVIMETRÍAS Y VALORES INICIALES	59
4.9. ESTABILIDAD A LARGO PLAZO	62
4.10. RESULTADOS A LARGO PLAZO	63
4.11. ESTABILIDAD EN CONDICIONES ACELERADAS	67
4.12. RESULTADOS EN CONDICIONES ACELERADAS	68
4.13. ESTABILIDAD EN CONDICIONES INTERMEDIAS	72
4.14. RESULTADOS EN CONDICIONES INTERMEDIAS	73
4.15. ESTUDIO MICROBIOLÓGICO	75
4.16. RESULTADOS ESTUDIO MICROBIOLÓGICO	79
DISCUSIÓN	84
CAPÍTULO II. SOLUCIÓN DE SULFATO DE COBRE AL 0,1 % .	91
INTRODUCCIÓN	91
PARTE TEÓRICA	91
1. FARMACOLOGÍA	92
1.1. ACCIÓN TERAPÉUTICA	92
1.2. INDICACIONES	93
1.3. POSOLOGÍA	93
1.4. PRECAUCIONES	93
1.5. REACCIONES ADVERSAS	93
1.6. CONTRAINDICACIONES	94
1.7. INTERACCIONES CON OTROS MEDICAMENTOS .	94
1.8. ADVERTENCIAS Y CONSEJOS	94
2. DATOS FÍSICO - QUÍMICOS	94
2.1. N° CAS	94

2.2.	ESTRUCTURA QUÍMICA	94
2.3.	CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS	95
2.4.	ESTABILIDAD Y ALMACENAMIENTO	95
2.5.	REACCIONES DE IDENTIFICACIÓN	96
2.6.	MÉTODOS DE ANÁLISIS	97
2.6.1.	MÉTODOS DE ABSORCIÓN ATÓMICA ...	97
	PARTE EXPERIMENTAL	97
3.	MATERIALES	97
3.1.	MATERIAS PRIMAS	97
3.2.	CERTIFICADO DE ANÁLISIS	97
3.3.	INSTRUMENTAL DE LABORATORIO	98
3.4.	REACTIVOS	99
4.	MÉTODOS Y RESULTADOS	100
4.1.	CARACTERIZACIÓN DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS	100
4.2.	RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DE LOS CARACTERES ORGANOLÉPTICOS	100
4.3.	VALORACIÓN POR ABSORCIÓN ATÓMICA VALIDACIÓN ANALÍTICA	100
4.4.	RESULTADOS DE LA VALORACIÓN POR ABSORCIÓN ATÓMICA	101
4.4.1.	LINEALIDAD	101
4.4.2.	SENSIBILIDAD	106
4.4.3.	PRECISIÓN	107
4.4.4.	ROBUSTEZ	109
4.5.	ESTUDIO DE ESTABILIDAD DEL SULFATO DE COBRE EN SOLUCIÓN	110

4.6.	RESULTADOS. GRAVIMETRÍAS Y VALORES INICIALES	111
4.7.	ESTABILIDAD A LARGO PLAZO	113
4.8.	RESULTADOS A LARGO PLAZO	113
4.9.	ESTABILIDAD EN CONDICIONES ACELERADAS ..	115
4.10.	RESULTADOS EN CONDICIONES ACELERADAS ..	115
4.11.	INFLUENCIA DEL TIPO DE ENVASE	117
4.12.	RESULTADOS INFLUENCIA DEL TIPO DE ENVASE	118
4.13.	ESTUDIO MICROBIOLÓGICO	119
4.14.	RESULTADOS ESTUDIO MICROBIOLÓGICO ..	120
DISCUSIÓN		127
CAPÍTULO III. SOLUCIÓN DE EOSINA AL 2 %		144
INTRODUCCIÓN		145
PARTE TEÓRICA		145
1.	FARMACOLOGÍA	145
1.1.	ACCIÓN TERAPÉUTICA. INDICACIONES	145
1.2.	POSOLOGÍA	145
1.3.	PRECAUCIONES	146
1.4.	REACCIONES ADVERSAS	146
1.5.	INTERACCIONES CON OTROS MEDICAMENTOS...	146
1.6.	CONSERVACIÓN	146
2.	DATOS FÍSICO - QUÍMICOS	146
2.1.	Nº CAS	146
2.2.	ESTRUCTURA QUÍMICA	147
2.3.	CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS	147

2.4.	ESTABILIDAD Y ALMACENAMIENTO	148
2.5.	REACCIONES DE IDENTIFICACIÓN	148
2.6.	MÉTODOS DE ANÁLISIS	152
2.5.1.	MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS .	152
2.5.2.	MÉTODOS DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR	152
2.5.3.	MÉTODOS DE INFRARROJOS	152
	PARTE EXPERIMENTAL	154
3.	MATERIALES	154
3.1.	MATERIAS PRIMAS	154
3.2.	CERTIFICADO DE ANÁLISIS	154
3.3.	INSTRUMENTAL DE LABORATORIO	155
3.4.	REACTIVOS	156
4.	MÉTODOS Y RESULTADOS	157
4.1.	CARACTERIZACIÓN DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS	157
4.2.	RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DE LOS CARACTERES ORGANOLÉPTICOS	157
4.3.	VALORACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA UV. VALIDACIÓN ANALÍTICA	157
4.4.	RESULTADOS DE LA VALORACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA	157
4.4.1.	LINEALIDAD	157
4.4.2.	SENSIBILIDAD	165
4.4.3.	PRECISIÓN	166
4.4.4.	ROBUSTEZ	167
4.5.	VALORACIÓN POR RMN	168

4.6.	RESULTADOS DE LA VALORACIÓN POR RMN	169
4.7.	VALORACIÓN POR INFRARROJOS	174
4.8.	RESULTADOS DE LA VALORACION POR INFRARROJOS	175
4.9.	ESTUDIO DE ESTABILIDAD DE LA EOSINA EN SOLUCIÓN	179
4.10.	RESULTADOS. GRAVIMETRÍAS Y VALORES INICIALES	180
4.11.	ESTABILIDAD A LARGO PLAZO	182
4.12.	RESULTADOS A LARGO PLAZO	182
4.13.	ESTABILIDAD EN CONDICIONES ACELERADAS .	188
4.14.	RESULTADOS EN CONDICIONES ACELERADAS .	188
4.15.	ESTUDIO MICROBIOLÓGICO	194
4.16.	RESULTADOS ESTUDIO MICROBIOLÓGICO .	194
DISCUSIÓN		205
CONCLUSIONES FINALES		213
BIBLIOGRAFÍA		215

INTRODUCCIÓN

En la ley 29/2006, de 26 de julio, de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios en el Título II, capítulo I, artículo 8, apartado j), al igual que en el capítulo preliminar del Real Decreto 175/2001 de 23 de Febrero, se define como Preparado Oficinal a *“Aquel medicamento elaborado y garantizado por un farmacéutico o bajo su dirección, dispensado en su oficina de farmacia o servicio farmacéutico, enumerado y descrito por el Formulario Nacional, destinado a su entrega directa a los enfermos a los que abastece dicha farmacia o servicio farmacéutico”*.

Como medicamento que es, el preparado oficial además de las propiedades que se le confieren para el tratamiento o prevención de enfermedades debe cumplir con una serie de garantías como las garantías de seguridad, eficacia, identificación e información como se recoge en la Ley 29/2006 de 26 Julio, de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios. (1)

Dentro de las garantías de información se incluye el etiquetado donde se reflejará la fecha de caducidad. Esta fecha de caducidad se debe establecer en su más estricto sentido en función de unos estudios de estabilidad previamente realizados.

No obstante en el campo de la formulación magistral no existen muchos estudios sobre la estabilidad de este tipo de preparados a pesar del tiempo que llevan utilizándose en la práctica profesional. Hay estudios realizados sobre fórmulas como metadona y captopril en solución (2), de omeprazol en suspensión (3), también sobre una formulación oral líquida de morfina para pediatría (4) y sobre suspensiones orales de carbamazepina (5). También se ha publicado recientemente un informe sobre la estabilidad de una suspensión oral de tacrolimus (6).

La normativa sobre la elaboración de fórmulas magistrales y preparados oficiales viene perfectamente definida en el RD 175/2001 de 23 de Febrero. Las oficinas de farmacia se han ido adaptando a este RD e incluso hay un estudio de investigación sobre cómo adaptarse a los requerimientos administrativos con propuestas concretas en cuanto a procedimientos normalizados de trabajo (7) por lo que, según R. Puerto “la aparición de unas

normas mínimas de calidad permite exigir y defender que todas las fórmulas magistrales y preparados oficinales que se elaboren en España tengan un nivel de calidad suficiente” (8). Según la normativa, en los preparados oficinales y en las fórmulas magistrales tipificadas se establecerá la fecha de caducidad de acuerdo con la que figure en la monografía correspondiente del Formulario Nacional y en el resto de las fórmulas magistrales, la fecha se establecerá en función de la duración del tratamiento prescrito; sin embargo la determinación de la estabilidad real de los preparados oficinales es un tema de una gran importancia si tenemos en cuenta los siguientes aspectos. En primer lugar para el farmacéutico tanto de hospital como el comunitario le es de gran utilidad tener estudios realizados que reproduzcan fielmente las condiciones habituales de almacenamiento en sus estanterías y así establecer una referencia más fiable. En segundo lugar porque es necesario promover una revisión metódica de la estabilidad de los preparados oficinales ya que en algunos casos tienen períodos de validez excesivamente cortos, lo cual es posible que no sea real, a la vista de los estudios hasta ahora realizados donde se determinan plazos de validez superiores a los 3 meses (5 y 6). Es sabido que muchas veces por simple tradición que nadie sabe realmente cuando se inició se dan por válidas determinadas premisas que en absoluto están evidenciadas aplicando el método científico, o bien se establecen períodos de validez en función simplemente de la duración máxima del tratamiento que suele ser de tres meses. Es fundamental seguir investigando en este sentido dado el número de fórmulas magistrales y sobre todo preparados oficinales que no tienen establecido un período de estabilidad real. Otra característica que se debe tener en cuenta y que reafirma la importancia de establecer períodos de validez más reales es que los Preparados Oficinales se pueden fabricar por lotes y quedar almacenados en las estanterías de la oficina de farmacia hasta su dispensación, lo que hace necesario disponer de datos fidedignos.

Por otro lado los estudios de estabilidad de medicamentos comercializados por la industria farmacéutica han avanzado claramente en los últimos 40 años. En la década de los años 70 (9) se comenzaron a diseñar, con una base científica, los procedimientos necesarios para realizar una cuantificación eficaz de la estabilidad de los mismos.

Esta normalización de los procedimientos para los estudios de estabilidad de medicamentos afectó no sólo al campo científico sino también al legislativo. De hecho existe una normativa basada en un acuerdo internacional como son las diferentes normas del ICH (Comité Internacional de Armonización) que se expondrán más adelante.

No es así en lo que a los preparados oficinales se refiere, pues no hay ninguna normativa específica para determinar la estabilidad o validez de este tipo de preparados.

Con este trabajo se pretende establecer un procedimiento estandarizado, según la norma ICH y validado para el cálculo del período de estabilidad. Para ello se han elegido tres Preparados Oficinales de uso habitual: minoxidil al 2% en solución hidroalcohólica (10), sulfato de cobre al 0,1% en solución acuosa (11) y eosina al 2% en solución acuosa (12).

La solución de minoxidil al 2% es un preparado utilizado para el tratamiento de la alopecia androgénica. Es un producto que aunque existen marcas comercializadas por la industria farmacéutica, se puede preparar por las oficinas de farmacia como preparado oficial resultando más económico para el paciente. La solución acuosa de sulfato de cobre al 0,1% es un producto galénico ampliamente utilizado como astringente, antiséptico y antifúngico para determinadas indicaciones como puede ser el tratamiento tópico de diferentes tipos de infecciones de la piel. La solución acuosa de eosina al 2%, también se utiliza como antiséptico tópico en infecciones cutáneas. Estos dos últimos productos no están comercializados por la industria.

Todas las oficinas de farmacia y servicios de farmacia del hospital están obligadas a dispensarlas siempre que se les demande y cualquier oficina de farmacia que esté autorizada para la elaboración de fórmulas magistrales y preparados oficinales puede preparar en su laboratorio estos productos, razón de más para realizar este tipo de estudios.

Los estudios aunque se han realizado por separado en cuanto a la preparación de muestras, elección de materiales, técnicas y documentación bibliográfica, dado que se trata de estudios de estabilidad, comparten determinados aspectos que son comunes a los tres.

OBJETIVO

Los estudios publicados en la bibliografía encaminados a determinar el plazo de validez de los preparados oficinales no son muy numerosos y además son relativamente recientes puesto que la mayor parte de ellos se ha realizado en estos últimos 10 años, sobre todo a raíz de la publicación del Formulario Nacional en 2003. Por lo tanto se considera importante aportar más estudios de estabilidad en este tipo de productos.

El objetivo específico de este trabajo es establecer los períodos de validez para tres preparados oficinales: solución de minoxidil al 2%, solución de sulfato de cobre al 0,1% y solución de eosina al 2%, considerando los factores que pueden influir en su plazo de validez como son la temperatura de almacenamiento y la posible contaminación microbiana principalmente. En el caso del sulfato de cobre también se ha incluido otra condición más como es la influencia del tipo de envase. Los dos primeros preparados, solución de minoxidil y solución de sulfato de cobre se han elegido por su muy frecuente utilización en la práctica diaria profesional, mientras que la solución de eosina se ha elegido porque el período de validez que se indica en el Formulario, Nacional es muy corto (7 días).

Se pretende establecer una metodología que sirva de referencia para posteriores estudios de estabilidad de otros preparados oficinales o fórmulas magistrales tipificadas o no tipificadas. De esta manera se pretende mantener abierta una línea de estudio e investigación donde se fundamenten con más evidencias científicas los períodos de validez de este tipo de productos de gran frecuencia de utilización tanto en la oficina de farmacia como en los servicios de farmacia hospitalarios.

PLANTEAMIENTO

Para la consecución de estos objetivos se ha dividido la tesis en tres capítulos. En el capítulo I se realiza un estudio teórico y práctico del minoxidil como principio activo y del preparado oficial solución de minoxidil al 2%, realizando estudios de estabilidad del preparado oficial a largo plazo donde se objetiva la influencia de la temperatura ambiente ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) para

determinar su período de validez, en condiciones aceleradas a una temperatura de $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y en condiciones intermedias ($30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$). También se realiza un estudio microbiológico de las muestras para la ver la posible contaminación por bacterias y hongos.

En el capítulo II se realiza un estudio teórico y práctico del sulfato de cobre como principio activo y del preparado oficial solución de sulfato de cobre al 0,1%, con sus correspondientes estudios de estabilidad del preparado oficial a largo plazo y en condiciones aceleradas. Se analiza además la influencia de tres tipos de envase en la concentración de sulfato de cobre en solución, dado que se pueden producir fenómenos de adsorción y absorción en el envase. En el caso de los otros dos preparados se estudia sólo su estabilidad en envases de vidrio topacio por ser ambas sustancias fotosensibles (13), (14), (15). Por último se realiza el estudio microbiológico para determinar la posible contaminación por bacterias y hongos.

En el capítulo III se realiza un estudio teórico y práctico de la eosina como principio activo y del preparado oficial solución de eosina al 2%, llevando a cabo estudios de estabilidad de este preparado a largo plazo y en condiciones aceleradas. Se completa el estudio con un análisis microbiológico para determinar la posible contaminación por bacterias y hongos.

CAPÍTULO I.

SOLUCIÓN DE MINOXIDIL AL 2%

INTRODUCCIÓN

La solución de Minoxidil al 2% lleva muchos años utilizándose en la oficina de farmacia. Es un producto de libre dispensación como preparado oficial que es. Fue introducido en el Formulario Nacional (FN) en la primera actualización dentro de la primera edición en el año 2007(10). Hasta entonces ha sido utilizado como medicamento industrial bajo diferentes nombres comerciales (Regaine®, Lacovin®) y también como fórmula magistral no tipificada, antes de la edición del Formulario Nacional, prescrita por los médicos habitualmente. No obstante, a pesar de ser un producto muy utilizado hay escasos estudios realizados para determinar la estabilidad del preparado a nivel de oficina de farmacia, tan sólo encontramos uno donde establecen la constante de degradación del minoxidil, pero en unas condiciones de envejecimiento que no son las habituales de almacenamiento (16).

El período de validez (caducidad) que se establece en el Formulario Nacional es, como máximo, de tres meses para la mayoría de las fórmulas magistrales tipificadas y de los preparados oficiales. Se ha establecido este período de validez por considerarse los tres meses el máximo período de duración de tratamiento que debe llevar una prescripción médica en nuestro sistema nacional de salud en el momento de la publicación del Formulario Nacional. Sin embargo en publicaciones de estudios realizados en otros países se establecen períodos de validez superiores, por ejemplo de 2 años para las soluciones de uso externo con un 15 % g/g de etanol (17).

El minoxidil se desarrolló inicialmente como medicamento antihipertensivo por la compañía Upjohn. Apareció en la literatura en 1968 (18). Los primeros ensayos clínicos en humanos datan de 1969 y tras muchos trabajos de investigación clínica se comercializó en comprimidos por primera vez con el nombre de Loniten®. El descubrimiento en ensayos clínicos de su capacidad para estimular el crecimiento capilar y revertir la calvicie en hombres

hizo que se tomara un interés renovado en este producto como agente antialopécico.

Fue en 1980 cuando Zappacosta (19) comentó en una carta dirigida a la revista "*New England Journal of Medicine*", la frecuente aparición de hipertrichosis en pacientes hipertensos tratados con este fármaco, comprobándose posteriormente que este efecto se producía también tras la aplicación tópica, lo que puso en marcha una serie de ensayos clínicos encaminados a establecer la efectividad, la posología, la tolerancia y el mecanismo de acción.

La "*Health Protection Branch*" de Canadá fue el primer organismo que en 1996 aceptó su empleo en la alopecia androgénica; posteriormente en 1997 fue aceptado su uso por los organismos sanitarios Americano y Europeo comercializándose con los nombres de Regaine® y Rogaine®. Más tarde se autorizó por la FDA su venta como producto OTC. (20)

Aunque según algunos autores (19 y 21) la aplicación tópica del minoxidil tiene algún efecto sobre el crecimiento del cabello en la alopecia, los incrementos de pelo pigmentado no velloso parecen relacionarse más con el aumento del grosor y la coloración del vello existente, que con el crecimiento de pelo nuevo (22).

PARTE TEÓRICA

1. FARMACOLOGÍA

1.1. GRUPO TERAPÉUTICO

D11AX: Otros preparados dermatológicos (23).

1.2. ACCIÓN TERAPÉUTICA

El minoxidil tiene acción vasodilatadora. Se utiliza como antihipertensivo y como antialopécico (24 y 25).

1.3. MECANISMO DE ACCIÓN

En este trabajo se hará sólo referencia a las propiedades antialopécicas. El mecanismo de acción por el que el minoxidil estimula el crecimiento del cabello no se conoce con exactitud. Puede alterar el metabolismo androgénico en el cuero cabelludo, o también, debido a su efecto vasodilatador, puede aumentar la microcirculación alrededor del folículo piloso (26).

El minoxidil, aplicado localmente, estimula el crecimiento de los corneocitos in vitro e in vivo; no aumenta el número de folículos capilares sino que convierte parcialmente los pelos miniaturizados e intermedios en pelos terminales, retardando la progresión de la alopecia androgénica en determinados pacientes. Dicha estimulación se produce después de 4 o más meses de tratamiento y es variable entre pacientes.

La suspensión del tratamiento detiene el crecimiento del cabello y en 3 ó 4 meses se puede volver a la alopecia de antes del tratamiento. Después de 6 a 12 meses de tratamiento ininterrumpido, una tercera parte de los pacientes han presentado respuestas positivas (26).

En los ensayos clínicos controlados, la aplicación por vía cutánea de minoxidil en pacientes normotensos o hipertensos, no ha puesto en evidencia manifestaciones relacionadas con la absorción del minoxidil.

1.4. FARMACOCINÉTICA DEL MINOXIDIL POR VÍA TÓPICA

Absorción: El minoxidil, administrado por vía cutánea, sólo se absorbe ligeramente dependiendo de la concentración a la que se encuentre.

Así pues a la concentración al 2%, alrededor del 1,4% (rango de valores: 0,3 al 4,5%) de la dosis aplicada llega a la circulación sistémica. A partir de una aplicación de 1 ml (20 mg de minoxidil), la cantidad de minoxidil absorbido es aproximadamente de 0,28 mg.

Sin embargo a la concentración del 5%, una cantidad media de 1,7% (0,3-4,5%) de la dosis aplicada, llegaría a la circulación general. De manera que 1 ml en forma de solución, que corresponde a una aplicación cutánea de 50 mg de minoxidil, produce una absorción de 0,85 mg de minoxidil. (27)

Teniendo en cuenta que la dosis más pequeña de minoxidil I.V. que produce efectos hemodinámicos clínicamente significativos en pacientes con hipertensión leve a moderada, es de 6,86 mg, se deduce que en ninguno de los dos casos (2% y 5%) se alcanzan niveles suficientes, para que se pueda objetivar un efecto hipotensor.

Los resultados de los estudios farmacocinéticos indican que los tres factores más importantes en relación con el aumento de la absorción del minoxidil en la piel son los siguientes:

- aumento cuantitativo de la dosis aplicada.
- aumento de la frecuencia de aplicación.
- reducción de la función barrera del estrato córneo de la epidermis.

Tras una aplicación de minoxidil por vía cutánea, la absorción del mismo no se ve influida por factores como: el sexo, la exposición a rayos ultravioleta, la aplicación simultánea de un producto hidratante, la oclusión (utilización de cabello postizo), la evaporación del disolvente (utilización de un secador) o la superficie de la zona de aplicación.

Los niveles plasmáticos de minoxidil tras la administración por vía cutánea dependen del grado de absorción. Cuando se interrumpe la aplicación, aproximadamente el 95% del minoxidil absorbido se elimina en 4 días.

Tanto minoxidil como su metabolito se excretan principalmente por vía renal.

1.5. INDICACIONES

Alopecia androgénica: Tratamiento de la alopecia androgénica de intensidad moderada en adultos varones.

1.6. POSOLOGÍA

El tratamiento se administra por vía tópica.

Adultos: 1 ml de solución dos veces al día (una aplicación por la mañana y otra por la noche) se aplica sobre el cuero cabelludo, partiendo del centro de la zona que se vaya a tratar, siendo la dosis máxima diaria de 2 ml, independientemente de la superficie tratada. No debe aumentarse la dosis aplicada ni la frecuencia de las aplicaciones.

- Se debe aplicar el producto de la manera indicada, los 7 días de la semana, como mínimo 6 meses. El crecimiento del cabello se manifiesta aproximadamente a los 4 meses de tratamiento, pudiendo variar en función del individuo.

- La experiencia clínica ha demostrado que después de interrumpir el tratamiento, se detiene el crecimiento de los nuevos cabellos, se produce una aceleración de la caída y disminuye la densidad del mismo, pudiendo volver a los niveles previos al tratamiento pasados 3 - 4 meses. (28)

- Niños No se ha establecido la seguridad y eficacia de minoxidil administrado por vía cutánea en pacientes menores de 18 años.

- Ancianos: No se ha establecido la seguridad y eficacia de minoxidil administrado por vía cutánea en pacientes mayores de 65 años.

- Normas para la correcta administración: Con anterioridad a la aplicación del producto, debe asegurarse que el cabello y el cuero cabelludo están totalmente secos. Se debe aplicar sobre el cuero cabelludo, extendiendo el producto (la solución o gel) con las yemas de los dedos sobre la zona a tratar, partiendo del centro de la misma.

Es necesario lavarse bien las manos antes y después de aplicar la solución.

1.7. PRECAUCIONES

- Dermatitis del cuero cabelludo:

En pacientes con dermatosis o lesiones cutáneas de cuero cabelludo puede producirse una mayor absorción percutánea del principio activo, por lo que deberá asegurarse que éstas no existen antes de su aplicación.

Aunque los estudios realizados con minoxidil tópico no han demostrado una absorción sistémica importante, existe la posibilidad de que se produzca una pequeña absorción local a través del cuero cabelludo por lo que se recomienda una monitorización regular de la tensión arterial y de la frecuencia cardíaca en pacientes que presenten algún problema cardíaco o cardiovascular como: riesgo potencial de edema, arteriopatía periférica, arritmia cardíaca, insuficiencia cardíaca o valvulopatía.

No se debe poner en contacto con piel erosionada, mucosas u ojos. Si hubiera contacto accidental, es preciso lavar con agua fría abundante.

No es recomendable el uso de pelucas durante el tratamiento.

1.8. REACCIONES ADVERSAS

Las reacciones adversas más frecuentes son las alteraciones dermatológicas de carácter leve como: descamación, eritema, dermatitis, hipertrichosis (en zonas distales) y reacciones de hipersensibilidad: (1-10%) como prurito, quemazón cutánea, dermatitis por contacto, sequedad de piel, dermatitis exfoliativa (0,1-1%), especialmente al iniciarse el tratamiento, cabello poco uniforme, hirsutismo (<0,1%), acné, reacciones alérgicas (hipersensibilidad, rinitis, exantema, eritema generalizado y edema facial).

También puede haber reacciones adversas de tipo cardíaco (0,1-1%) como taquicardia, palpitaciones, hipotensión, incremento o disminución del pulso, así como del sistema nervioso: (0,1-1%): cefalea, parestesia (<0,1%), mareo y trastornos de gusto, oculares: (<0,01%): lagrimeo alterado, alteraciones de la visión, otorrinolaringológicas: (<0,1%): sinusitis, otitis (particularmente, otitis externa) y sexuales como la disfunción sexual.

1.9. CONTRAINDICACIONES

Está contraindicado en embarazo, lactancia (en caso de absorción sistémica se excreta por la leche materna) y menores de 18 años.

2.0. SOBREDOSIS

- Síntomas: La sobredosis accidental o voluntaria tras la aplicación tópica producirá un aumento en la intensidad de las reacciones adversas dermatológicas, especialmente prurito, sequedad, irritación cutánea y eczema. Asimismo, la absorción sistémica será mayor, con el consiguiente incremento en la probabilidad de sufrir efectos sistémicos.

La ingestión accidental podría causar la aparición de efectos sistémicos debido a la acción vasodilatadora del minoxidil (5 ml de solución al 2% contienen 100 mg de minoxidil, que es la dosis máxima utilizada por vía oral, en adultos, para el tratamiento de la hipertensión arterial). Entre estos signos y síntomas están hipotensión, taquicardia, retención hidrosalina con aparición de edemas, derrame pleural o fallo cardiaco congestivo.

- Tratamiento: El tratamiento del cuadro desarrollado por ingestión accidental requiere el empleo de diuréticos para el edema, beta-bloqueantes u otros inhibidores del sistema nervioso simpático para la taquicardia y cloruro sódico en solución isotónica intravenosa para la hipotensión.

Simpaticomiméticos, como adrenalina y noradrenalina, deben evitarse por la sobreestimulación cardíaca que producen.

2.1. TOXICIDAD

Categoría C de la FDA. Los estudios realizados en animales no han demostrado un efecto nocivo en el embarazo, desarrollo embrionario/fetal, parto o durante el desarrollo postnatal. No existen datos clínicos disponibles sobre la exposición de mujeres embarazadas a minoxidil por lo que no se recomienda su uso durante el embarazo.

Debido a que el minoxidil administrado por vía oral se excreta por la leche materna, no se recomienda su uso durante el periodo de lactancia.

No se ha establecido la seguridad y eficacia de minoxidil tópico en menores de 18 años.

No se ha establecido la seguridad y eficacia de minoxidil tópico en pacientes mayores de 65 años.

2.2. INTERACCIONES CON OTROS MEDICAMENTOS

Antihipertensivos: Aunque no ha sido constatado clínicamente, existe la posibilidad de que el minoxidil incremente el riesgo de hipotensión ortostática en pacientes en tratamiento concomitante con vasodilatadores periféricos y fármacos antihipertensivos como guanetidina y derivados.

2.3. ADVERTENCIAS Y CONSEJOS

CONSEJOS AL PACIENTE:

- Evitar su uso en caso de heridas en el cuero cabelludo.
- Este producto es para aplicar sobre el cuero cabelludo, por lo que se debe evitar su ingestión o inhalación.
- Aplicar sobre el cuero cabelludo perfectamente seco empezando por el centro de la zona a tratar, y mediante un masaje con las yemas de los dedos, extender el producto en el área a tratar. Si se utiliza la solución se recomienda el lavado de manos con agua abundante antes y después de la aplicación.
- Después de la aplicación tape bien el frasco.
- Se deberá respetar la dosis diaria recomendada independientemente de la extensión de la alopecia.
- Se debe advertir al paciente que puede ser necesario un tratamiento previo de 4 meses antes de que existan indicios de crecimiento de pelo.
- Cuando se interrumpe el tratamiento, el crecimiento puede cesar y volver al estadio inicial de alopecia en 3-4 meses.
- Aclarar abundantemente con agua en caso de contacto accidental con los ojos, piel lesionada o mucosas.

CONSIDERACIONES ESPECIALES:

- Previamente a su aplicación será necesaria la realización de una historia clínica y una exploración física completa.

- No utilizar en presencia de heridas o dermatosis del cuero cabelludo hasta que éstas hayan curado, debido a que puede haber incremento de la absorción y de efectos adversos sistémicos.

- Existe la posibilidad de que se produzca una pequeña absorción local a través del cuero cabelludo por lo que se recomienda una monitorización regular de la tensión arterial y de la frecuencia cardíaca.

- Si aparecen efectos sistémicos como latidos de corazón acelerados o palpitaciones, aumento rápido e inexplicado de peso, hinchazón de manos, codos y cara, aturdimiento, mareo o desmayo, visión borrosa, dolor torácico, de manos u hombros o irritación del cuero cabelludo o alguna otra reacción que se sospeche que pueda deberse a la aplicación de este medicamento, se debe interrumpir el tratamiento.

- Por su contenido en etanol y/o propilenglicol como excipientes, las aplicaciones frecuentes pueden producir irritación y sequedad de la piel.

- Se debe evitar el contacto con los ojos. En caso de contacto accidental con superficies sensibles se recomienda el lavado de las mismas con abundante agua.

- No deberá aplicarse concomitantemente en la misma zona con otros productos tópicos tales como corticoides, retinoides o pomadas oclusivas ya que pueden aumentar su absorción.

- Se aconseja consultar al dermatólogo si no hay crecimiento capilar en mujeres a los 8 meses usando la concentración al 2% y en hombres a los 12 meses usando la concentración al 2%.

2. DATOS FÍSICO - QUÍMICOS

2.1. N° CAS

El minoxidil está descrito en las farmacopeas más habituales. El número CAS, Código del Chemical Abstracts del minoxidil es el 38304-91-5.

2.2. ESTRUCTURA QUÍMICA

El minoxidil es un fármaco que pertenece al grupo de los vasodilatadores periféricos. Su fórmula química es: 6-(Piperidin-1-il) pirimidina-2,4-diamina 3 óxido, (figura 1) y tiene un peso molecular de 209,25. Presenta la siguiente composición porcentual: C 51,66%, H 7,22%, N 33,47%, O 7,65%. Su fórmula empírica es $C_9H_{15}N_5O$.

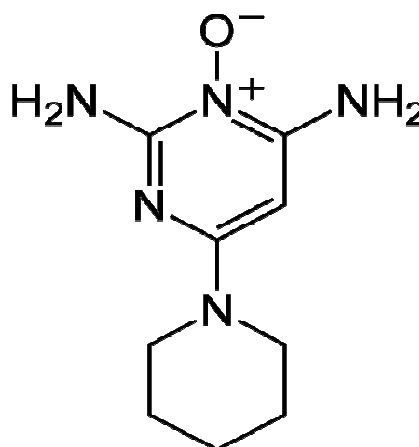


Figura 1. Minoxidil

2.3. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS

✚ El minoxidil contiene no menos del 98,5 por ciento y no más del equivalente al 101,0 por ciento de 6-(piperidin-1-il) pirimidina-2,4-diamina 3 óxido (29).

✚ Polvo cristalino blanco o prácticamente blanco, poco soluble en agua, soluble en metanol, etanol y propilenglicol y muy poco soluble en éter (16).

✚ El punto de fusión varía en un amplio intervalo de valores. Estos valores incluyen datos desde 225°C hasta valores de 264°C con descomposición. (24).

✚ En disolución tiene un aspecto límpido y no más intensamente coloreada que la disolución de referencia A_6 (método II, 2.2.2) (29).

✚ La conservación debe ser en envases cerrados y protegidos de la luz.

✚ La pérdida por desecación no es más del 0,5 por ciento, determinada en 1 g mediante desecación en una estufa de 100 °C a 105 °C.

Las cenizas sulfúricas no son más del 0,1 por ciento determinadas en 1 g.

2.4. ESTABILIDAD Y ALMACENAMIENTO

El Minoxidil es una sustancia relativamente estable a temperatura ambiente y no muestra evidencias de una descomposición significativa. Sin embargo, cuando se expone a temperatura elevada (200 ° C) se descompone en su compuesto desoxigenado, el desoximinoxidil.

La degradación del minoxidil en solución a 20 ° C a pH = 7, en buffer de fosfato sigue una cinética de degradación de orden 1, con una constante de degradación de $9,464 \times 10^{-3} \text{ día}^{-1}$ y una energía de activación de 11,7 Kcal/mol. La degradación es ácido-base dependiente, mostrando la mayor estabilidad a pH 5,0 (24).

2.5. REACCIONES DE IDENTIFICACIÓN

En la RFE están descritos los siguientes métodos de identificación (29):

A. Disolver 20 mg de producto en ácido clorhídrico 0,1 M y diluir hasta 100,0 ml con el mismo disolvente (disolución A). Tomar 2,0 ml de solución y llevar hasta 100 ml con el mismo ácido clorhídrico (disolución B). Diluir 2 ml de esta última solución hasta 100, 0 ml con hidróxido sódico 0,1 M (disolución C). Examinar las disoluciones B y C entre 200 nm y 350 nm. La disolución B presenta dos máximos de absorción, a 230 nm y a 281 nm, respectivamente. La absorbancia específica en el máximo a 230 nm es de 1.015 – 1.120, y en el máximo a 281 nm es de 1.060 – 1.170. La disolución C muestra tres máximos de absorción, a 230 nm, 262 nm y 288 nm. La absorbancia específica en el máximo a 230 nm es de 1.525 – 1685, en el máximo a 262 nm es de 485 – 535, y en el máximo a 288 nm es de 555 – 605.

B. Examinar la sustancia por cromatografía en capa fina utilizando u gel de sílice GF₂₅₄R.

Disolución problema: Solubilizar 10 mg de muestra en metanol y completar hasta 10 ml con el mismo disolvente.

Disolución de referencia: Disolver 10 mg de minoxidil SQR en metanol y llevar hasta 10 ml con el mismo disolvente.

Aplicar por separado a la placa 2 microlitros de cada disolución y desarrollar hasta una distancia de 10 cm, empleando una mezcla formada por 1,5 volúmenes de metanol. Dejar secar la placa al aire y examinar con luz ultravioleta a 254 nm. La mancha principal en el cromatograma obtenido con la disolución problema es similar, en posición y tamaño, a la mancha principal en cromatograma obtenido con la disolución de referencia.

C. Solubilizar aproximadamente 10 mg de la sustancia que se examina en 1 ml de metanol y añadir 100 microlitros de solución acuosa de sulfato de cobre al 12,5 % (p/v); se produce una coloración verde que cambia a amarillo verdoso por adición de 100 microlitros de ácido clorhídrico diluído al 7,3 % (p/v).

Ensayos:

Aspecto de la disolución. Disolver 0,5 g de la sustancia a examinar en 12,5 ml de metanol y diluir hasta 25 ml con agua. La disolución es límpida y no está más intensamente coloreada que la disolución de referencia.

También se determinan los metales pesados, la pérdida por desecación y las cenizas sulfúricas.

Impurezas:

Las impurezas descritas en la RFE son las siguientes:

- A. 3-óxido de 6-cloropirimidina-2,4-diamina.
- B. 6-cloropirimidina-2,4-diamina.
- C. 3-(cianoimino)-3-piperidinopropanoamida.
- D. 3-óxido de 6 [[[4-metilfenil)sulfonil]oxi]pirimidina-2,4-diamina.

2.6. MÉTODOS DE ANÁLISIS

2.6.1. MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS

La Farmacopea americana emplea la espectroscopia ultravioleta para la determinación del minoxidil en muestras que se obtienen tras la disolución de comprimidos de minoxidil. (30). El minoxidil presenta un pico de absorción a 230 nm, según diferentes trabajos aportados por la farmacopea americana , y por diversos autores (25 y 31).

Existen otros métodos espectrofotométricos como la colorimetría y el infrarrojo para determinar minoxidil, pero en nuestro trabajo se ha elegido preferentemente el ultravioleta por disponer de la tecnología adecuada y ser un método más rápido e igualmente fiable que los otros.

2.6.2. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se ha convertido en el método más importante para la determinación de minoxidil en las formas de dosificación. La técnica ofrece ventajas evidentes sobre otras técnicas como la capacidad para detectar la presencia de posibles productos de degradación y/o productos contaminantes intermediarios provenientes de la síntesis.

PARTE EXPERIMENTAL

3. MATERIALES

3.1. MATERIAS PRIMAS

Minoxidil. Laboratorio Fagron Ibérica S.A.U.

3.2. CERTIFICADO DE ANÁLISIS

En el RD 175/2001 (32), se establece claramente que el proveedor de la materia prima debe estar autorizado. Siempre que se recepcione una materia prima por la oficina de farmacia por su proveedor autorizado se acompañará el certificado de análisis correspondiente que avale la garantía de calidad de la materia prima.

Por otro lado también se recoge en este RD las especificaciones que debe cumplir la materia prima que se utilizará en la elaboración de fórmulas magistrales y preparados oficinales. Las especificaciones consisten en una descripción detallada de las características de calidad de las materias primas, incluyendo las condiciones para su manipulación, cuando proceda.

Se recogerá como mínimo:

a) los requisitos que debe satisfacer la materia prima, según se establece en la Real Farmacopea Española (RFE) o, en su defecto, en una de reconocido prestigio (32): identificación de la materia prima, su riqueza, si procede, posibles impurezas y descripción de los procedimientos analíticos que permitan la definición de las mencionadas características.

b) las condiciones de conservación.

c) las características específicas de peligrosidad y toxicidad y las precauciones a tomar durante su manipulación.

En el caso de la materia prima minoxidil, se han tomado como referencia las especificaciones establecidas en la PhE por ende en la RFE monografía 937.

En cuanto a riqueza el minoxidil contiene no menos del 98,5 por ciento y no más del equivalente al 101,0 por ciento de 3-óxido de 6-(piperidin-1-il)pirimidina-2-4-diamina, calculado con respecto a la sustancia desecada.

Sus características físicas son las siguientes: Se trata de un polvo cristalino blanco o casi blanco, poco soluble en agua, soluble en metanol y en propilenglicol.

Se pidió por escrito el certificado de análisis de las materias primas al laboratorio proveedor (Fagron S.A.), que se muestra a continuación:

FAGRON IBERICA S.A.U · JOSEP TAPIOLAS,150 · ES-08226 TERRASSA · BARCELONA Tel 937310722 Fax 937311644 www.fagron.es				Pg. 1 19-08-09
Certificado de Análisis				
MINOXIDILO				
PM	209,3	Próximo Control Analítico	30/03/14	
Nº CAS	38304-91-5	Nº Análisis	MON-049975	
Nº Producto	32481-00	Nº Lote	09C23-B01	
Fecha Conclusión	19/08/09	Cód. Muestra	MON-049975	
	Calidad Final	PH.EUR 6.3		
INCI				
Características	Polvo cristalino blanco o casi blanco. Poco soluble en agua, soluble en metanol y propilenglicol.			
ENSAYOS	ESPECIFICACIONES	RESULTADOS	METODO	
Identificación	A #B #C #D	Conforme	A0132481-00	
Aspecto de la disolución	Limpida y no más coloreada que disol. ref. A6	Conforme	A0232481-00	
Sustancias relacionadas	Test Ph.Eur.	Conforme	A0732481-00	
Pérdida por desecación	< 0.5 %	< 0.1 %	A0832481-00	
Riqueza	98.5 - 101.0 %	100.2 %	A1032481-00	
Metales pesados	< 20 ppm	< 20 ppm	A1232481-00	
Cenizas sulfúricas	< 0.1 %	< 0.1 %	A1332481-00	
Disolventes Residuales	Test Ph.Eur.	Conforme	AEB32481-00	
Conservación	En envase bien cerrado, protegido de la luz			
Anna Codina Directora Técnica Farmacéutica				

3.3. INSTRUMENTAL DE LABORATORIO

Balanza, sartorius BP 310 P

Balanza, sartorius BP 2100

Matraces aforados de vidrio de 1000 ml y 100 ml

Teflón de agitación

Espectrofotómetro BECKMAN DU7.

HPLC Modular Jasco

- Formado por los siguiente módulos
 - . Bomba (Jasco PU-1580)
 - . Desgasificador (Jasco DG-2080-53)
 - . Formador de gradiente (Jasco LG-2080-02)
 - . Detector UV/Visible (Jasco UV-1575)
 - . Inyector de muestras (Jasco AS-2050-Plus)
- Interfaz de cromatografía (Hercule Lite)
Columna ACE 5 C₁₈ (4,6 mm x 150 mm id., 10 µm). Ref.
ACE – 121 – 1516.
- Columna Partisil ODS 10 (4,6 mm x 200 mm., 10 µm). Ref.
TR-016333

Cubeta de cuarzo, METLER.

Pipetas de 1 ml y 10 ml

Jeringas de 1 ml. ICO.

Placas Petri con agar caseína-soja

Placas Petri con agar glucosa de Sabouraud

Estufa programada a 25° C

Estufa programada a 40° C

Estufa programada a 30° C

Estufa programada a 20 - 25° C

Estufa programada a 30 - 35° C

Filtros Millipore® de 0,45 µm de diámetro de poro

Aparatos de filtración estéril

Pipetas estériles de 1 ml y 10 ml

Pinzas estériles

Bomba de vacío

Tubos de ensayo de vidrio con algodón

Gradillas

Viales de vidrio topacio de 5 ml

Tapones de goma

Alicates cierra viales

3.4. REACTIVOS

Etanol 96 ° sin indicador. Laboratorio Fagron Ibérica S.A.U.

Propilenglicol. Laboratorio Fagron Ibérica S.A.U.

Agua purificada. Laboratorio Guinama S.A.

Diluyente y líquido de lavado Millipore® (solución de peptona y cloruro sódico tamponada a pH 7) (33).

Docusato Sódico. (Roig Farma)

Metanol.

Ácido acético glacial.

Agua Purificada. Dpto. Tecnología Fca. Facultad de Farmacia. UCM.

4. MÉTODOS Y RESULTADOS

4.1. CARACTERIZACIÓN DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS

Siempre que se recibe una materia prima, es conveniente realizar una observación directa de la misma y comprobar que el aspecto es el que se describe en la farmacopea o en las fuentes bibliográficas adecuadas. Se procedió por lo tanto a la observación directa de las materias primas con la que se iba a trabajar en el laboratorio.

4.2. RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DE LOS CARACTERES ORGANOLÉPTICOS

Se observó su apariencia externa color, textura y olor. El minoxidil es un sólido blanco pulverulento.

4.3. VALORACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA UV. VALIDACIÓN ANALÍTICA.

El método que se utilizó para medir la concentración de minoxidil fue una Espectrofotometría de Absorción Ultravioleta.

En el análisis farmacéutico la tendencia mayoritaria es la utilización de métodos lo más selectivos posibles, en los que la presencia de otros componentes tengan escasa influencia en los resultados, por ejemplo métodos cromatográficos. No obstante, se pueden utilizar métodos menos específicos (espectrofotométricos), si existen métodos complementarios que demuestren la ausencia de sustancias que puedan interferir. (34)

También es cierto que la espectrofotometría UV – Vis fue uno de los primeros métodos físicos que se aplicó al análisis cuantitativo y a la elucidación estructural y aunque la espectroscopia Infrarroja (IR) y la Resonancia Magnética Nuclear son las técnicas más idóneas para el análisis cualitativo y estructural, la espectrofotometría UV-Vis supera al resto de los métodos ópticos de análisis en lo referente al análisis cuantitativo (35).

Para identificar el producto se debe demostrar que el método es capaz de discriminar sin interferencias el analito, las sustancias de composición similar y los productos que puedan estar presentes en la muestra.

No obstante en el análisis rutinario no es necesaria la confirmación completa de la estructura química o composición y basta entonces con comparar con una sustancia de referencia.

También es cierto que antes de realizar un análisis hay que definir previamente, un método eficaz, preciso y exacto con el cual se pueda posteriormente identificar y cuantificar el producto que se vaya a analizar.

Este requerimiento hace que sea necesario validar el método, que consiste en comprobar que el método cumple con aquello para lo que está cualificado.

En este trabajo de investigación se han seguido las directrices y regulaciones de la ICH, concretamente las normas:

- Q2 (R1) (antes Q2A y Q2B): Validación de procedimientos analíticos. Definiciones y terminología. (Noviembre de 2005) (36).

Para la validación del método analítico, de acuerdo con estas directrices, se han determinado los siguientes parámetros:

- Linealidad (Límites de detección y confianza, para un grado de confianza del 95%).
- Sensibilidad (Límites de detección y cuantificación).
- Precisión (Repetibilidad y precisión intermedia).
- Robustez

El método que se ha utilizado en primer lugar ha sido la Espectrofotometría de Absorción ultravioleta (Beckman DU7). Este método se ha empleado tanto para la valoración de minoxidil en una disolución hidroalcohólica constituida por alcohol etílico de 96º/agua purificada, propilenglicol en una proporción de 70:20:10, como para la eosina en una solución con agua purificada exclusivamente.

Se han considerado las siguientes características de funcionamiento:

- **Fiabilidad:** que son las características que demuestran la capacidad de un método analítico para mantener a lo largo del tiempo los criterios fundamentales de validación.
- **Practicabilidad:** que son las características que deciden si el procedimiento analítico es fácil o difícilmente realizable en la práctica.
- **Idoneidad:** que son el conjunto de parámetros que garantizan que el sistema responde, en el momento del análisis, a los requisitos fijados en la validación del método.

4.4. RESULTADOS DE LA VALORACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA

4.4.1 LINEALIDAD

La concentración del minoxidil como preparado oficial es del 2% lo que equivale a 20 mg/ml por lo que se realizaron diferentes muestras independientes a diferentes concentraciones. Las concentraciones elegidas fueron de 5; 7,5; 10; 15; 20; 25; 27,5 y 30 mg/ml (concentraciones que equivalen al 0,5%, 0,75%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 2,75% y 3%).

A partir de estas concentraciones se realizaron las correspondientes diluciones de la siguiente manera: de cada muestra se tomó 1 ml y se diluyó hasta 100 ml en un matraz aforado con el disolvente hidroalcohólico (alcohol 96° 70%, propilenglicol 10% y agua purificada 20%), después de cada muestra obtenida (concentraciones diluidas 1/100) se volvió a tomar 1 ml y se diluyó otra vez hasta 100 ml con el disolvente hidroalcohólico antes mencionado. Las concentraciones obtenidas finales fueron de 0,5; 0,75; 1; 1,5; 2; 2,5; 2,75; y 3 µg/ml. Este proceso se realizó por cuadruplicado.

En las técnicas espectroscópicas se debe cumplir la Ley de Lambert Beer:

$$A = \epsilon \cdot l \cdot c$$

(donde A es la absorbancia, ϵ es el coeficiente de extinción, l es el espesor del material absorbente, y c es la concentración).

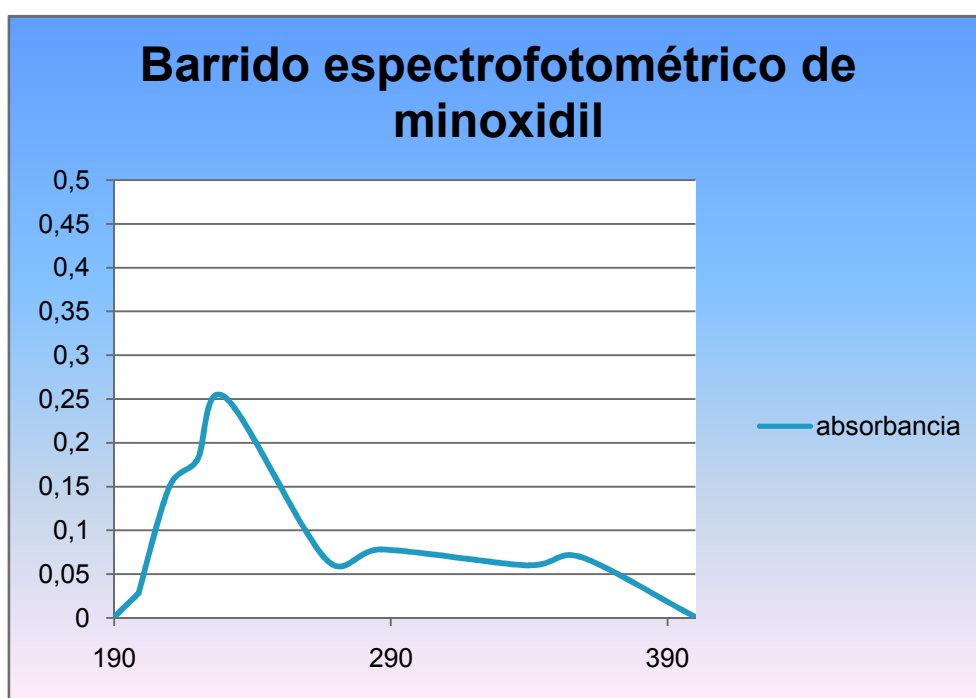
La ley de Lambert Beer exige que todas las medidas de absorbancia sean realizadas a la longitud de onda de máxima absorción, por eso se realizó un barrido espectral para detectar la longitud de onda de máxima absorción de

la molécula de minoxidil a partir de la solución madre (minoxidil 2% en solución hidroalcohólica).

El máximo de absorción viene descrito en la RFE y es de 230 nm (RFE 2005), por eso el barrido se realizó en un rango de 190 a 400 nm. El resultado de máxima absorbancia coincidió con la RFE.

A esta longitud de onda se midieron las absorbancias de las diluciones preparadas y se procedió a su estudio estadístico para ver si la relación obtenida entre concentraciones y absorbancias era significativa y si había linealidad entre ambos factores.

Por lo que lo primero que se realizó fue un barrido espectral con el principio activo disuelto en una solución de alcohol de 96 ° (70%) agua purificada (20 %) y propilenglicol (10%), constituyendo ésta la disolución madre. Ver Gráfica 1.



Gráfica 1: Barrido espectrofotométrico (190 – 390 nm) del minoxidil

λ	absorbancia
286,5	0,078
266,8	0,066
230	0,252

Tabla 1: Valores del barrido espectrofotométrico.

Se obtuvo un pico de absorción a 230 nm, lo que está en consonancia con los valores descritos en la bibliografía (25). Después se realizaron diferentes diluciones en el disolvente descrito anteriormente.

En la tabla 2 se muestran los valores obtenidos de las absorbancias de cada muestra y los valores de factores respuesta, (dividiendo la absorbancia por la concentración).

Concentración	nº prueba	Absorbancia	factor respuesta
0,5 µg/ml	1	0,0766	0,1532
	2	0,0845	0,1690
	3	0,0764	0,1528
	4	0,0769	0,1538
0,75 µg/ml	1	0,1384	0,1845
	2	0,1230	0,1640
	3	0,1333	0,1777
	4	0,1250	0,1667
1 µg/ml	1	0,1559	0,1559
	2	0,1602	0,1602
	3	0,1642	0,1642
	4	0,1651	0,1651
1,5 µg/ml	1	0,2611	0,1741
	2	0,2432	0,1621
	3	0,2450	0,1633
	4	0,2505	0,1670
2 µg/ml	1	0,3316	0,1658
	2	0,3279	0,1640
	3	0,3256	0,1628
	4	0,3246	0,1623
2,5 µg/ml	1	0,4073	0,1629
	2	0,4019	0,1608
	3	0,4103	0,1641
	4	0,3849	0,1540
2,75 µg/ml	1	0,4580	0,1665
	2	0,4573	0,1663
	3	0,4599	0,1672
	4	0,4544	0,1652
3 µg/ml	1	0,5016	0,1672
	2	0,4878	0,1626
	3	0,4908	0,1636
	4	0,4903	0,1634

Tabla 2. Resultados obtenidos en el ensayo de linealidad entre valores de absorbancia frente a concentración de minoxidil

A continuación, en la tabla 3 se resumen los valores de los límites de predicción y confianza que están representados posteriormente en la gráfica 2.

	absorbancia	95%		95%	
concentración	Predicho	Límites de predicción		Límites de confianza	
X	Y	Inferior (U.A.)	Superior(U.A.)	Inferior(U.A.)	Superior(U.A.)
0,5	0,0825	0,0660	0,0990	0,0777	0,0874
3,0	0,4920	0,4755	0,5086	0,4872	0,4968

Tabla 3. Límites de predicción y confianza para el valor mínimo y máximo de la recta de calibrado.

Los resultados del Análisis de la varianza (ANOVA) realizado sobre la pendiente y la ordenada de la recta de calibrado, se muestran en la tabla 4.

Análisis de Regresión - Modelo Lineal $Y = a + b \cdot X$

Variable dependiente: absorbancia

Variable independiente: concentración

Parámetro	Estimación	Error estándar	Estadístico T	p- valor
Ordenada	0,0006	0,0030	0,2179	0,8289
Pendiente	0,1637	0,0015	106,739	0,0000

Tabla 4: Parámetros de regresión lineal de la absorbancia frente a la concentración.

Dado que el p-valor en la tabla ANOVA es inferior a 0,01, existe una relación estadísticamente significativa entre absorbancia y concentración para un nivel de confianza del 99%.

El estadístico R^2 (coeficiente de determinación) indica que el modelo explica un 99,74% de la variabilidad en absorbancias. El coeficiente de correlación es igual a 0,99, indicando una relación relativamente fuerte entre las variables. El error estándar de la estimación muestra la desviación típica de los residuos que es 0,0077. Este valor se usa para construir los límites de la predicción para las nuevas determinaciones.

El error absoluto medio (MAE) de 0,0053 es el valor medio de los residuos. El estadístico de Durbin-Watson (DW) examina los residuos para determinar si hay alguna correlación significativa basada en el orden en el que se han introducido los datos del fichero. Dado que el p-valor es superior a 0,05, no hay indicio de autocorrelación serial en los residuos.

Análisis de la varianza

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente – F	p- valor
Modelo	0,6841	1	0,6841	11393,20	0,0000
Residuo	0,0018	30	0,00006		
Falta de ajuste	0,0008	6	0,00013	3,26	0,0174
Error puro	0,0009	24	0,00004		
Total (Corr.)	0,6859	31			

Tabla 5: Valores del análisis de la varianza

Coeficiente de Correlación = 0,99
 R-cuadrado = 99,73 porcentaje
 R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 99,72 porcentaje
 Error estándar de est. = 0,0077
 Error absoluto medio = 0,0053
 Estadístico de Durbin-Watson = 2,0694 (P=0,3482)
 Autocorrelación residual en Lag 1 = -0,0454

Se realizó el test de falta de ajuste para determinar si el modelo seleccionado es adecuado para describir los datos observados o si se debería utilizar un modelo más complicado. El test se realiza comparando la variabilidad de los residuos del modelo actual con la variabilidad entre las observaciones a valores duplicados de la variable independiente X. Dado que el p-valor para la falta de ajuste en la tabla 5 (ANOVA) es inferior a 0,05, existe una falta de ajuste estadísticamente significativa para un nivel de confianza del 95%, por lo que se realizó una evaluación complementaria de la bondad del ajuste al modelo lineal y una comparación de modelos alternativos. En la tabla 5 se muestra que de los modelos ajustados el modelo lineal proporciona el valor de R^2 más alto con 99,74 %, siendo este modelo el más adecuado para los datos observados.

Comparación de Modelos Alternativos

Modelo	Correlación	R-cuadrado
Lineal	0,9987	99,74%
Multiplicativo	0,9980	99,61%
Doble inverso	0,9956	99,12%
Log Probit	0,9939	98,78%
Raíz cuadrada-X	0,9934	98,68%
Raíz cuadrada-Y	0,9924	98,48%
Logístico	0,9858	97,18%
Logarítmico-X	0,9754	95,15%
curva-S	-0,9748	95,02%
Exponencial	0,9711	94,31%
Inverso-X	-0,9008	81,15%
Inverso-Y	-0,8822	77,82%

Tabla 6. Esta tabla muestra los resultados de ajuste a los datos de varios modelos curvilíneos.

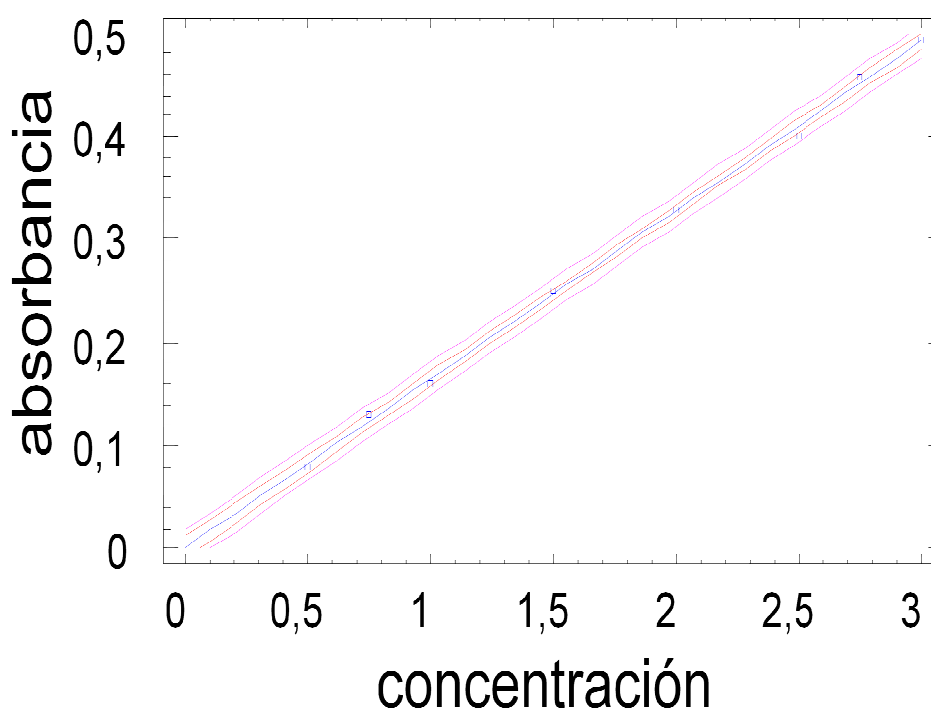
De los modelos que muestra la tabla 6, el modelo lineal procura el valor de R^2 más alto. Por lo tanto, todos los tratamientos estadísticos realizados indican que el método propuesto de espectrofotometría ultravioleta es lineal, al menos, en el intervalo de concentraciones seleccionado.

A continuación se muestran los resultados de ajuste del modelo lineal para describir la relación existente entre la absorbancia y la concentración del fármaco.

La ecuación del modelo ajustado es:

$$\text{Absorbancia (U.A.)} = 0,000657169 + 0,1638 \cdot \text{concentración}$$

Recta de calibración



Gráfica 2: Regresión lineal de los datos de absorbancia frente a concentraciones obtenidas ($\mu\text{g/ml}$) en el ensayo de linealidad con los límites de confianza del 95%.

En la gráfica 2 se muestra la representación del mejor ajuste lineal entre las absorbancias y las concentraciones (línea azul). Los límites de predicción (líneas rojas internas) corresponden a las hipérbolas de la gráfica más cercanas a los puntos obtenidos experimentalmente, para un nivel del 95%; y los intervalos de confianza (líneas rosas externas), para un nivel de confianza del 95%, corresponden a las hipérbolas más separadas de los puntos experimentales.

Como se puede observar en la gráfica, todos los puntos de los resultados obtenidos se encuentran dentro de los límites de confianza y predicción.

4.4.2. SENSIBILIDAD (límites de detección y cuantificación)

Este estudio se realiza para evaluar el grado en el que nuestro método es capaz de detectar el minoxidil en las muestras que se analicen. En este apartado se estudian los límites de detección y cuantificación. Para el cálculo de estos límites se tomaron los valores de 13 muestras de una misma concentración. Se eligió la concentración de 2 µg/ml y se midieron en el espectrofotómetro a 230 nm.

En la tabla 7 se muestran los resultados de la absorbancia de las 13 muestras.

Muestras	Absorbancia
1	0,3240
2	0,3347
3	0,3194
4	0,3196
5	0,3359
6	0,3377
7	0,3230
8	0,3261
9	0,3230
10	0,3219
11	0,3221
12	0,3253
13	0,3240
Media	0,3259
D.S.	0,0060
C.V. (%)	1,86%

Tabla 7: Valores de absorbancia.

Concentración de 2 µg/ml.

La fórmula que se emplea para hallar los valores de ambos límites es:

$$CI = (K * S_{bl}) / b$$

Donde

K : Constante que toma valores de tres para el límite de detección y de diez para el límite de cuantificación.

S_{bl} : Desviación estándar de las muestras : 0,0060

b : Pendiente de la recta de calibrado : 0,1638

Los límites calculados son respectivamente

L. Detección: 0,1109 µg/ml

L. Cuantificación: 0,3698 µg/ml

4.4.3. PRECISIÓN (Repetibilidad y precisión intermedia)

Se estudian la repetibilidad y la precisión intermedia, tomando como repetibilidad la posible variabilidad que hay en los resultados de un mismo análisis en las mismas condiciones realizadas por el mismo analista y en el mismo día. La precisión intermedia evalúa la precisión del método frente a variaciones internas del laboratorio (analista, día, instrumento, etc.). Es la precisión intralaboratorio.

Repetibilidad.

Se realizó un mínimo de tres muestras a tres concentraciones distintas para cubrir el intervalo especificado. A continuación se leyeron las absorbancias en el espectrofotómetro, en el mismo día todas ellas.

nº de muestra	C = 1 µg/ml	C = 2 µg/ml	C = 3 µg/ml
1	0,1639	0,3151	0,4910
2	0,1669	0,3236	0,4890
3	0,1659	0,3237	0,4934
Media	0,1656	0,3208	0,4911
D.S.	0,0015	0,0049	0,0022
C.V. (%)	0,92 %	1,54 %	0,45 %

Tabla 8. Resultados del estudio de repetibilidad.

El coeficiente de variación nos indica que el método es repetible en el mismo día.

Precisión intermedia.

Se realizaron tres soluciones madre y de cada una de ellas se prepararon cuatro diluciones para tener las concentraciones siguientes: 1 µg/ml, 2 µg/ml, 2,5µg/ml y 3 µg/ml que fueron analizadas en el espectrofotómetro.

Este proceso se repitió en tres días distintos.

	concentraciones			
	1 µg/ml	2 µg/ml	2,5µg/ml	3 µg/ml
día 1	0,1624	0,3330	0,4010	0,4871
	0,1593	0,3264	0,4010	0,4893
	0,1593	0,3264	0,4051	0,4889
día 2	0,1624	0,3330	0,4136	0,5040
	0,1593	0,3264	0,4131	0,4887
	0,1593	0,3264	0,4077	0,4854
día 3	0,1639	0,3151	0,4000	0,4910
	0,1669	0,3236	0,3983	0,4890
	0,1659	0,3237	0,3981	0,4934
Media	0,1621	0,3260	0,4042	0,4908
D.S.	0,0030	0,0053	0,0060	0,0054
C.V. (%)	1,85%	1,64%	1,49%	1,11%

Tabla 9. Resultados de la precisión entre los tres días.

Los coeficientes de variación que aparecen en la tabla 9 son menores de 5%, lo que nos confirma que además el método tiene una buena precisión intermedia.

Por lo tanto, podemos afirmar que la curva de calibración obtenida en nuestros ensayos es adecuada y válida para comenzar nuestro estudio de estabilidad posterior.

4.4.4. ROBUSTEZ

La robustez es la medida de la capacidad de un método analítico para permanecer inalterado ante pequeñas pero deliberadas variaciones en ciertos parámetros, proporcionando idea de su fiabilidad o estabilidad durante su empleo en rutina (37). En nuestro caso se estudia la influencia del tiempo de análisis de las muestras conservadas a la luz y temperatura ambiente. Se realiza el análisis de la muestra recién preparada y después de 48 horas.

Para el cálculo de la robustez se tomaron los valores de 4 muestras de una misma concentración a tiempo 0 y 48 horas después de la elaboración de

la muestra. Se eligió la concentración de 2 µg/ml, y se midieron en el espectrofotómetro a 230 nm.

conc. 2 µg/ml	Tiempo	
Muestras	t = 0	t = 48 h
1	0,3196	0,3314
2	0,3216	0,3203
3	0,3261	0,3197
4	0,3316	0,3196
Media	0,3247	0,3228
D.S.	0,0053	0,0058
C.V. (%)	1,64%	1,79%
%minoxidil inalterado	100%	99,39%

Tabla 10: valores de robustez

De estos datos se concluye que las muestras pueden ser analizadas durante las 48 siguientes a su preparación.

Por lo tanto una vez realizada la validación del método podemos concluir que el método de análisis es lineal en el intervalo de concentraciones utilizado, fiable, practicable e idóneo. Por lo que nos servirá como método de análisis de las muestras objeto de estudio.

4.5. VALORACIÓN POR HPLC

La cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) es la técnica analítica de separación más ampliamente utilizada. Las razones de su amplio uso son su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para automatizarla, su capacidad para separar productos no volátiles o termolábiles, pero sobre todo, su amplia aplicabilidad a sustancias que es importante su determinación, muchos campos de las ciencias y para la sociedad en general (38).

El método utilizado es el descrito en la RFE (29) y, partiendo de la base de que los métodos de las Farmacopeas se consideran validados, (39) no es

necesario realizar ninguna revalidación a la hora de poner el método en marcha en cualquier laboratorio. Generalmente, estos métodos han sido sometidos a ensayos interlaboratorios para confirmar su buen funcionamiento al ser utilizados en diferentes centros de trabajo, o bien, se consideran validados por su utilización a lo largo del tiempo.

Se utiliza en este estudio como técnica complementaria a la determinación cuantitativa por espectrofotometría uv del minoxidil. Se usa un patrón elaborado en el momento y se compara su espectro con la sustancia problema y se ve si hay picos diferentes que puedan hacer sospechar la existencia de productos diferentes al minoxidil, que podrían ser productos de degradación que serían imposibles de detectar utilizando únicamente la técnica habitual en los estudios de estabilidad que como ya se ha comentado es la espectrofotometría uv/vis.

Según la monografía de la RFE (29) la cromatografía se puede llevar a cabo utilizando los siguientes materiales:

- Una columna de acero inoxidable de 0,10 m de longitud y 3 mm de diámetro interno, rellena de gel de sílice octadecilsililado para cromatografía R (5 μ m),
- Como fase móvil, a un caudal de 1 ml/min, una mezcla preparada como sigue: se disuelven 3,0 g de docusato de sodio R en una mezcla de 10 ml de ácido acético glacial R y 300 ml de agua R, se ajusta a pH 3,0 con ácido perclórico R y se añaden 700 ml de metanol R,
- Como detector, un espectrofotómetro ajustado a 240 nm,
- Un inyector de bucle de 10 μ l.

El procedimiento de determinación según la RFE, consiste en inyectar volúmenes de 10 μ l de la solución de referencia y de la problema y continuar la cromatografía durante dos veces el tiempo de retención del pico principal.

En el cromatograma obtenido con la disolución problema, la suma de las áreas de cualquiera de los picos, aparte del principal, no es más de 1,5 veces el área del pico principal en el cromatograma obtenido con la disolución de referencia (1,5 %). (29)

En nuestro estudio se han utilizado los siguientes materiales:

Fase móvil: un 30 % de una mezcla de varios productos (3 g de Docusato sódico, 10 ml de ácido acético glacial y 300 ml de agua purificada) y un 70% de metanol, ajustado todo ello a pH = 3.

Una columna ACE 5 C₁₈ de 4,6 mm x 150 mm. Ref. ACE-121-1516 en unas pruebas y una columna Partisil ODS 10 (4,6 mm x 200 mm., 10 µm). Ref. TR-016333 en otras ocasiones.

Un Flujo de 1 ml/minuto y un volumen de inyección de 100 µl. El espectrofotómetro fue ajustado para leer a 240 nm. Las muestras de minoxidil se diluyen hasta obtener una concentración de 10 µg/ml.

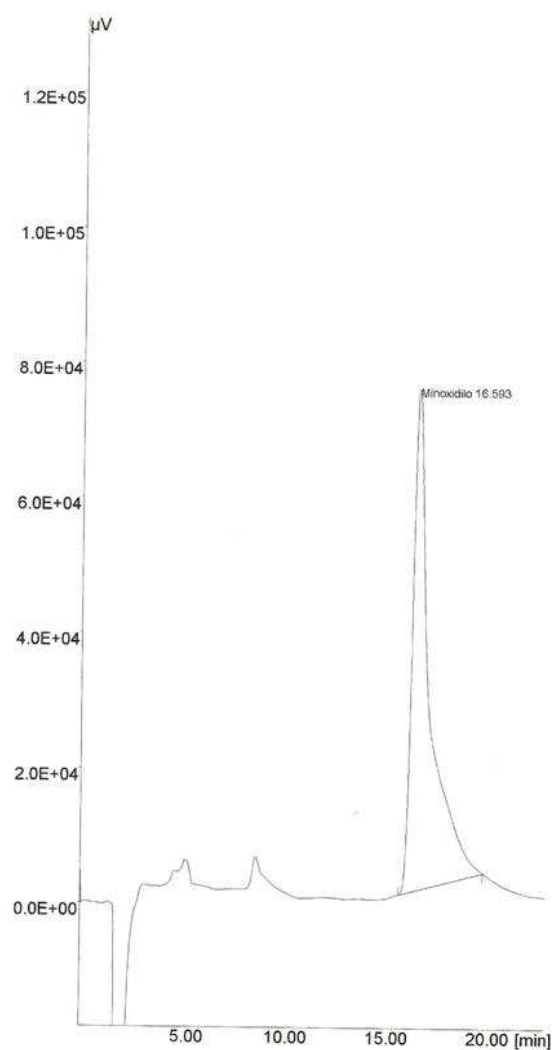
Estos ajustes no han variado la calidad del método.

4.6. RESULTADOS HPLC

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 11 y la gráfica 6.

Valores de HPLC		3 meses		6 meses	
		Tª conservación	Tª conservación	Tª conservación	Tª conservación
	Patrón	25 °C	40 °C	25 °C	40 °C
Área	3928,1	4113	3913,47	3872,23	4390,7
% recuperación	100%	104,71%	99,63%	98,58%	111,78%

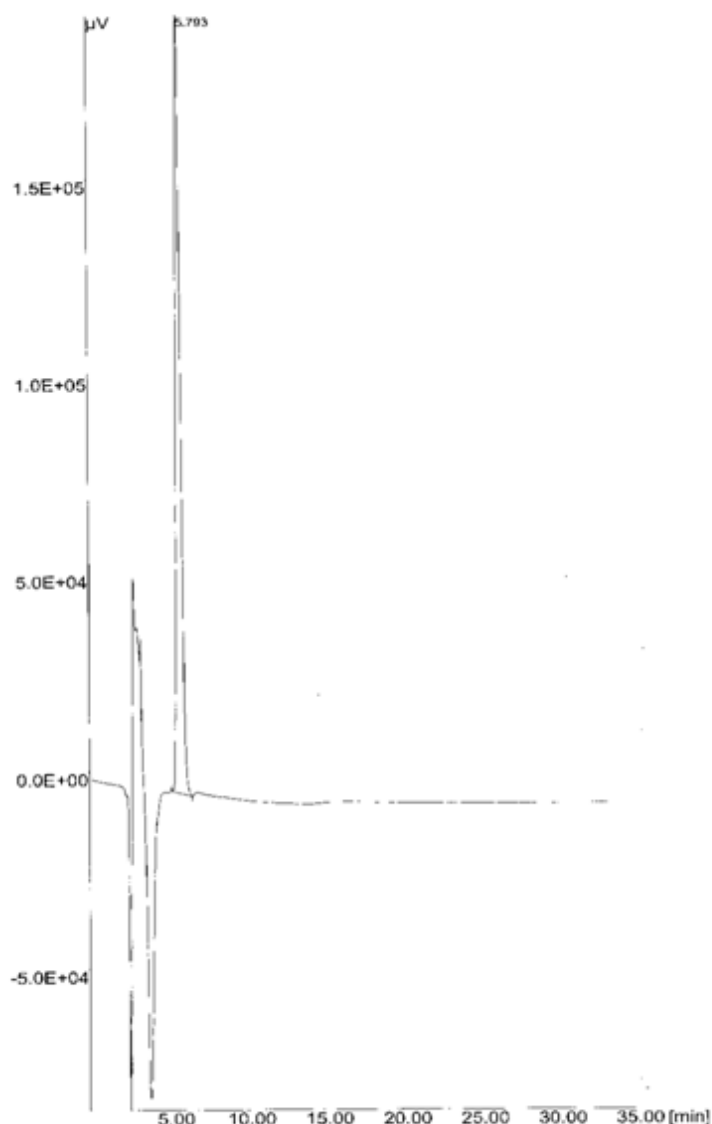
Tabla 11: Valores de HPLC



Gráfica 3: HPLC a los tres meses.

Valores de HPLC a los 12 meses.			
		T ^a conservación	T ^a conservación
	Patrón	25 °C	40 °C
Área	4110,87	4041,8	4735,6
% recuperación	100%	98,32%	115,20%

Tabla 12: Valores de HPLC a los 12 meses



21-Jan-2011 14:24:08

Gráfica 4: HPLC a los 12 meses.

Los valores obtenidos de concentración a los tres meses de almacenamiento tanto para la temperatura de 25 °C como la de 40 °C están dentro de un intervalo de $\pm 5\%$ con respecto a la muestra patrón. En los tiempos 6 y 12 meses observamos un aumento por encima del 105% en el porcentaje de recuperación, sólo para las muestras que han sido almacenadas a 40 °C. Esto puede ser debido a una posible evaporación del disolvente y una consecuente concentración del analito. Lo más concluyente es que no se observaron picos diferentes que pudieran hacer sospechar la existencia de posibles productos de degradación.

4.7. ESTUDIO DE ESTABILIDAD DEL MINOXIDIL EN SOLUCIÓN

Para realizar el estudio de estabilidad del minoxidil al 2% en solución se considerarán los siguientes factores: la riqueza en principio activo, la temperatura y la contaminación microbiológica.

En el formulario Nacional se establece para el preparado oficial de minoxidil al 2% una estabilidad de 3 meses (40), pero no aporta ninguna metodología ni estudio o referencia bibliográfica donde se haya realizado algún estudio de estabilidad. (10).

En el Formulario terapéutico magistral de Bélgica (41), se establece una fecha de caducidad de dos meses, pero tampoco aporta ningún estudio de estabilidad.

En la revista *Apotheker Zeitung* (42) se recomendaba el plazo de validez recogido por el Laboratorio de Farmacéuticos Holandeses de La Haya (43). En este artículo el período de validez para soluciones de uso externo, con un 15% g/g de etanol se establece en dos años.

Normas ICH

Los estudios de estabilidad de medicamentos han avanzado considerablemente en la industria farmacéutica en los últimos 40 años. Al disponer de métodos analíticos adecuados, HPLC, espectrofotometría, etc. Existía también por otro lado la necesidad de una normativa internacional que sirviera de referencia para establecer los requisitos y procedimientos de los estudios de estabilidad para la comercialización de medicamentos en las distintas partes del mundo. El 1 de enero de 1998 entró en vigor, en la Unión Europea (UE), Japón y Estados Unidos, la directriz principal ICH Q1A(R2) (44), elaborada por el Comité Internacional de Armonización, relativa a Los Procedimientos de los Estudios de Estabilidad de Nuevos Principios Activos y Medicamentos.

Además de la reglamentación internacional existen normativas regionales. En el caso de la Unión Europea esta actividad es competencia de la Agencia Europea para la Evaluación de Medicamentos (EMA), a través del Comité de Especialidades Farmacéuticas (CPMP). (9).

La directriz ICH Q1A(R2) unifica los requerimientos mínimos de datos de estabilidad exigidos por las autoridades de la UE, EE.UU y Japón para la solicitud de autorización de comercialización de nuevos principios activos y medicamentos derivados, aunque no es de obligado cumplimiento, siempre y cuando existan motivos justificados científicamente para utilizar procedimientos alternativos.

En nuestro caso se está hablando de un preparado oficial de un principio activo ya existente, por lo que la normativa más adecuada sería la CPMP/QWP/122/02 (45), aprobada en Junio de 2003 y cuya entrada en vigor fue en Marzo de 2004, aunque realmente no existe una normativa específica que se refiera a este tipo de preparados que no son de fabricación industrial, sino a pequeña escala en oficina de farmacia o servicio farmacéutico de hospital.

En cualquier caso esta normativa nos sirve de guía e inspiración para la realización de nuestro estudio.

En esta directriz (ICH Q1A(R2)) se establece que el procedimiento general para realizar un estudio de estabilidad hará referencia a los siguientes puntos:

- Objetivos del estudio
- Características de las muestras a utilizar
- Condiciones de almacenamiento
- Frecuencia del muestreo
- Propiedades a analizar en las muestras a cada tiempo de muestreo
- Presentación y evaluación de los resultados
- Conclusiones

El objetivo de un estudio de estabilidad es aportar evidencias de cómo la calidad de un principio activo o de un medicamento varía a lo largo del tiempo, bajo la influencia de factores ambientales, como por ejemplo, la temperatura, la humedad y la luz.

Se pueden diferenciar cuatro tipos de estudios de estabilidad (a largo plazo, acelerados o intermedios, forzados y en uso) según los objetivos que se persigan.

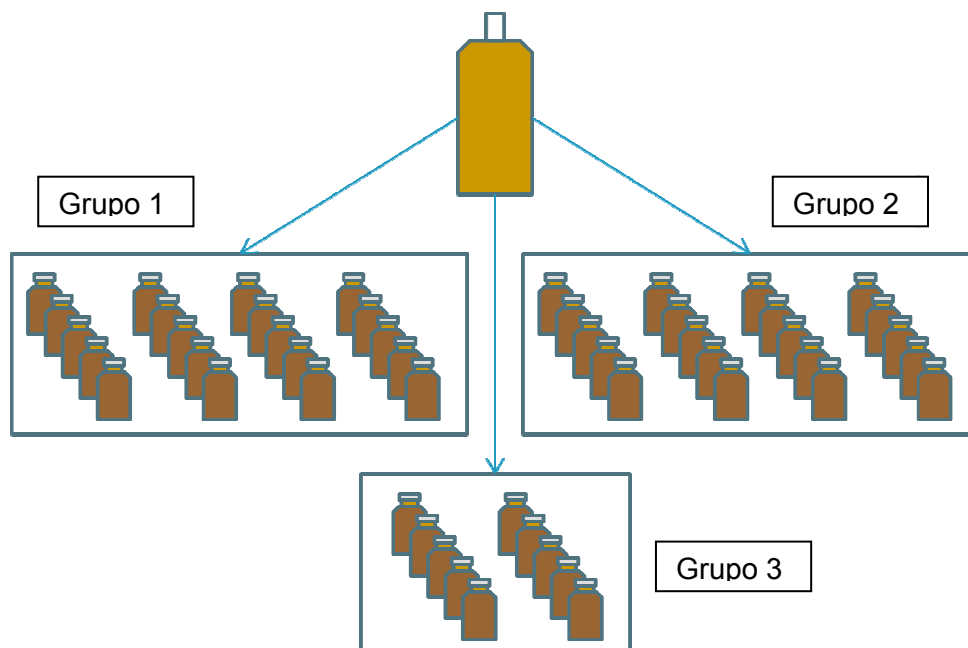
En este estudio se realizarán los de a largo plazo y los acelerados o intermedios dado que lo que nos interesa es establecer las condiciones de conservación y evaluar el efecto sobre el principio activo de estancias en condiciones distintas de las condiciones de conservación recomendadas.

En este caso por tratarse de un principio activo disuelto en una solución hidroalcohólica y envasado en un envase de vidrio topacio e impermeable, se realiza el estudio en condiciones de humedad ambiental y controlando la temperatura de almacenamiento.

La metodología seguida para el estudio de estabilidad es la siguiente:

Se parte de un litro de solución de minoxidil al 2% y se ponen partes alícuotas en viales de vidrio topacio de 5 ml de capacidad, tantos como sean necesarios para distribuirlos en las diferentes condiciones de almacenamiento.

El esquema final es el siguiente:



Con esta distribución se obtienen 3 grupos de producto para ser almacenados bajo diferentes condiciones.

El grupo 1 de 20 viales se almacena en estufa a 25 °C, el grupo 2 de 20 viales a 40 °C y el grupo 3 compuesto por 10 viales se almacena a 30 °C.

Antes de proceder a su almacenamiento en estufa se hará un análisis espectrofotométrico para determinar la riqueza a tiempo cero de la solución madre preparada.

Se realiza una gravimetría de todos y cada uno de los viales antes de su almacenamiento en la estufa y se repetirá cada vez que se vaya a realizar el ensayo de potencia correspondiente.

Las determinaciones de potencia se realizan a tiempos: 0, 1, 3, 6 y 12 meses como mínimo.

4.8. RESULTADOS. GRAVIMETRÍAS Y VALORES INICIALES.

Los viales preparados a partir del lote original minoxidil 2 %, se pesaron previamente con el objeto de controlar a posteriori cualquier desviación significativa en peso que pudiera hacer sospechar una evaporación del disolvente con el consiguiente aumento de la concentración de la solución original.

Los datos obtenidos son los siguientes:

viales almacenados a 25 ° C					
Muestras	tiempo 0	tiempo 1 mes	tiempo 3 meses	tiempo 6 meses	tiempo 12 meses
1	14,151	14,152			
2	14,365	14,366			
3	14,392	13,394			
4	14,230	14,232	14,232*		
5	14,390	14,392	14,392		
6	14,347	14,348	14,348		
7	14,664	14,664	14,664		
8	14,321	14,323	14,323		
9	14,282	14,283	14,283	14,282	
10	14,234	14,235	14,235	14,234	
11	14,989	14,990	14,990	14,989	
12	14,523	14,524	14,523	14,524	
13	14,203	14,204	14,204	14,204	14,202
14	14,488	14,489	14,489	14,488	
15	14,169	14,170	14,169	14,169	14,169
16	15,237	15,237	15,237	15,237	14,236
17	15,111	15,111	15,111	15,111	15,110
18	15,040	15,040	15,040	15,040	15,039
19	14,173	14,173	14,173	14,172	14,170
20	14,182	14,182	14,181	14,181	14,179

Tabla 13: gravimetrías de viales almacenados a 25° C

* Vial no utilizado por destrucción durante el proceso

viales almacenados a 30 ° C				
Muestras	tiempo 0	tiempo 1 mes	tiempo 3 meses	tiempo 6 meses
1	14,352	14,392	14,392	
2	14,420	14,420	14,420	
3	14,038	14,037	14,037	
4	14,420	14,419	14,419	14,419
5	14,388	14,388	14,387	14,387
6	14,324	14,324	14,324	14,324
7	14,480	14,480	14,480	14,480
8	14,296	14,296	14,295	14,295
9	14,217	14,217	14,217	14,217
10	14,600	14,600	14,600	14,600

Tabla 14: gravimetrías de viales almacenados a 30° C

viales almacenados a 40 ° C					
muestras	tiempo 0	tiempo 1 mes	tiempo 3 meses	tiempo 6 meses	tiempo 12 meses
1	14,326	14,322			
2	14,400	14,400			
3	14,391	14,387			
4	14,556	14,552	14,552		
5	14,253	14,249	14,248		
6	14,421	14,417	14,417		
7	14,416	14,406	13,492		
8	13,899	11,955	10,667		
9	14,349	14,345	14,343	14,341	
10	14,338	14,334	14,333	14,330	
11	14,303	14,299	14,298	14,295	
12	14,347	14,343	14,341	14,339	
13	14,037	14,034	14,033		
14	14,509	14,505	14,504	14,501	14,493
15	14,284	14,280	14,277	14,276	14,269
16	14,328	14,324	14,323	14,320	14,313
17	14,439	14,436	14,434	14,431	14,425
18	14,497	14,493	14,492	14,489	14,478
19	14,466	14,462	14,460	14,457	14,450
20	14,240	14,236	14,234	14,231	14,221

Tabla 15: gravimetrías de viales almacenados a 40° C

En color azul figuran los viales utilizados para determinar la potencia por medio de espectrofotometría a 230 nm. En rojo figuran los viales desechados por presentar un peso significativamente inferior al esperado. En color verde figuran los viales utilizados para la técnica de HPLC

Después se realizó una determinación por espectrofotometría a 230 nm, para comprobar la concentración de minoxidil a tiempo 0.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

vial 1	absorbancias	Promedio	concentración $\mu\text{g/ml}$	% recuperación
1	0,3196			
2	0,3216			
3	0,3261			
4	0,3316			
5	0,3421	0,3282	1,9997	99,99%
	des est.	0,00808332		
	c.v.	2,36%		

Tabla 16: Valores de absorbancia a tiempo 0.

Por los datos se observa que la concentración inicial está dentro de los límites de aceptación 95 – 105% (46), límites exigidos por las autoridades sanitarias.

Se realizaron determinaciones a diferentes tiempos de 1, 3, 6 y 12 meses después de la preparación de las muestras.

4.9. ESTABILIDAD A LARGO PLAZO

En los estudios de estabilidad a largo plazo el objetivo básico es establecer el período de validez y fijar las condiciones de conservación que han de figurar en el etiquetado del envase de acondicionamiento (9).

La elección de las condiciones de almacenamiento de las muestras para el estudio de estabilidad a largo plazo está basado en el análisis de los efectos de las condiciones climáticas en las tres áreas de aplicación de la directriz del ICH. Ver Tabla 17.

Zona Climática	Tipo de clima	Temperatura aritmética media (°C)	Temperatura cinética media derivada (°C)	Humedad Relativa (%)
I	Templado	20*	21	45
II	Subtropical (mediterráneo)	21,6	25	60
III	Cálido, seco	26,4	30	35
IV	Cálido, húmedo	26,7	30	70

* <19°C = 19°C

Tabla 17. Zonas climáticas.

La Unión Europea está incluida en las zonas climáticas I y II y a la hora de proponer un período de recontrol o de validez se consideran como condiciones de conservación generales de los principios activos y medicamentos las más extremas, en este caso las de la zona climática II y las condiciones de almacenamiento de las muestras de los estudios de estabilidad a largo plazo se establecen de acuerdo a estas condiciones de conservación, esto es, a una temperatura constante de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y una humedad relativa ambiental constante del $60\% \pm 5\%$. (9).

Es evidente que en nuestro estudio estas serán las condiciones elegidas para la evaluación de la estabilidad a largo plazo, por ser Madrid nuestro ámbito de trabajo.

Antes de cada determinación espectrofotométrica se realizó un barrido desde 190 a 400 nm, para descartar la posible aparición de picos diferentes al barrido inicial y comprobar además que el pico de máxima absorción sigue siendo de 230 nm. Después se procedió a la determinación de la concentración tras la valoración espectrofotométrica.

4.10. RESULTADOS A LARGO PLAZO

Valores al cabo de 1 mes

Barrido entre 190 y 400 nm de λ .

tª 25 ° c	
λ	Absorbancias
285,5	0,175
261	0,164
230	0,458

Tabla 18: barrido espectrofotométrico a tiempo = 1 mes a 25 ° C

Valores de concentración

datos a 230 nm				
vial 1	absorbancias	Promedio	concentración $\mu\text{g/ml}$	% recuperación
1	0,3154			
2	0,3123			
3	0,3150			
4	0,3031			
5	0,3029	0,3097	1,8870	94,35%
vial 2				
1	0,3306			
2	0,3259			
3	0,3277			
4	0,3481			
5	0,3163	0,3297	2,0090	100,45%
vial 3				
1	0,3291			
2	0,3253			
3	0,3177			
4	0,3234			
5	0,3300	0,3251	1,9808	99,04%
		conc media	1,9589	97,95%
		des est.	0,052	
		c.v.	2,66%	

Tabla 19: valores espectrofotométricos al cabo de 1 mes a 25 °C

Valores al cabo de 3 meses

Barrido entre 190 y 400 nm de λ .

tª 25 ° c	
λ	Absorbancias
286	0,117
261,5	0,108
230,5	0,327

Tabla 20: barrido espectrofotométrico a tiempo = 3 meses a 25 ° C.

Valores de concentración

datos a 230 nm				
vial 5	absorbancias	promedio	concentración $\mu\text{g/ml}$	% recuperación
1	0,3301			
2	0,3324			
3	0,3319			
4	0,3331			
5	0,3313	0,3318	2,0215	101,07%
vial 6				
1	0,3313			
2	0,3300			
3	0,3284			
4	0,3283			
5	0,3383	0,3313	2,0184	100,92%
vial 7				
1	0,3281			
2	0,3284			
3	0,3275			
4	0,3287			
5	0,3296	0,3285	2,0013	100,07%
		conc media	2,0137	100,69%
		des est.	0,0088	
		c.v.	0,44%	

Tabla 21: valores espectrofotométricos al cabo de 3 meses a 25° C.

Valores al cabo de 6 mesesBarrido entre 190 y 400 nm de λ .

tª 25 ° c	
λ	Absorbancias
285	0,106
261	0,097
230	0,302

Tabla 22: barrido espectrofotométrico a tiempo = 6 meses a 25 °C**Valores de concentración**

datos a 230 nm				
vial 11	absorbancias	promedio	concentración $\mu\text{g/ml}$	% recuperación
1	0,3137			
2	0,3347			
3	0,3179			
4	0,3159			
5	0,3140	0,3192	1,9450	97,25%
vial 12				
1	0,3201			
2	0,3180			
3	0,3181			
4	0,3187			
5	0,3200	0,3190	1,9434	97,17%
vial 14				
1	0,3313			
2	0,3297			
3	0,3319			
4	0,3296			
5	0,3304	0,3306	2,0143	100,71%
		conc media	1,9676	98,38%
		des est.	0,033017398	
		c.v.	1,68%	

Tabla 23: valores espectrofotométricos al cabo de 6 meses a 25 ° C.

Valores al cabo de 12 meses

Barrido entre 190 y 400 nm de λ .

tª 25 ° c	
λ	Absorbancias
285	0,110
262	0,102
230	0,306

Tabla 24: barrido espectrofotométrico a tiempo = 12 meses a 25 °C

Valores de concentración

datos a 230 nm				
vial 13	absorbancias	promedio	concentración µg/ml	% recuperación
1	0,3326			
2	0,3287			
3	0,3313			
4	0,3349			
5	0,3294	0,3314	2,0191	100,96%
vial 15				
1	0,3153			
2	0,3117			
3	0,3103			
4	0,3230			
5	0,3224	0,3165	1,9285	96,43%
vial 16				
1	0,3266			
2	0,3164			
3	0,3133			
4	0,3254			
5	0,3244	0,3212	1,9571	97,86%
		conc media	1,9683	98,41%
		des est.	0,037819236	
		c.v.	1,92%	

Tabla 25: valores espectrofotométricos al cabo de 12 meses a 25 ° C.

En el estudio a largo plazo se ha evaluado la concentración de minoxidil de las muestras almacenadas a 25 °C a diferentes tiempos.

En todos los intervalos de tiempo medidos se realizó un barrido espectral para detectar la posible aparición de picos de absorción diferentes al obtenido

en el inicio del estudio y que alertara de la existencia de que el producto ya no presentaba las mismas características espectrofotométricas. En ningún caso se han obtenido picos de absorción máximos diferentes a 230 nm, en ninguno de los intervalos de tiempo analizados. De la misma forma las concentraciones obtenidas están todas comprendidas entre el 95 y el 105% con unos coeficientes de variación también inferiores al 5%.

4.11. ESTABILIDAD EN CONDICIONES ACELERADAS

Las condiciones de almacenamiento en los estudios acelerados son más severas que en los estudios a largo plazo (9). Sus principales objetivos son determinar el efecto de estancias del principio activo o del medicamento fuera de las condiciones de conservación y apoyar extrapolaciones de estabilidad en las condiciones de conservación propuestas. (9).

Las muestras se almacenan a una temperatura constante de $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y una humedad relativa ambiental constante del $75\% \pm 5\%$.

Los valores predictivos de los datos de estabilidad química procedentes de un estudio en condiciones aceleradas se fundamentan en la ecuación de Arrhenius.

$$K = A \cdot e^{-\frac{Ea.1}{R.T}}$$

En función de la energía de activación de cada producto, se calcularía el factor de predicción de estabilidad. En el caso de las disoluciones, con valores de activación entre 40 y 125 KJ/mol, la oscilación del factor de predicción a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ estaría entre 2,2 y 11. Es decir un cambio de potencia X% a los seis meses de almacenamiento a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ se correspondería como mínimo con 13 meses aproximadamente a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($6 \times 2,2$).

Por ejemplo: la energía de activación del minoxidil en solución es de 11,7 Kcal/mol (24), lo que es igual a 48,95 KJ/mol por lo que nuestro factor de predicción sería de 2,58.

De igual manera que en el estudio a largo plazo antes de cada determinación espectrofotométrica se realizó un barrido desde 190 a 400 nm para descartar la posible aparición de picos diferentes al barrido inicial y comprobar además que el pico de máxima absorción seguía siendo a 230 nm.

4.12. RESULTADOS EN CONDICIONES ACELERADAS

Valores al cabo de 1 mes

Barrido entre 190 y 400 nm de λ .

tª 40 ° c	
λ	Absorbancias
286	0,094
262	0,079
230	0,274

Tabla 26: barrido espectrofotométrico a tiempo = 1 mes en condiciones aceleradas a 40 ° C.

Valores de concentración

datos a 230 nm				
vial 1	absorbancias	promedio	concentración $\mu\text{g/ml}$	% recuperación
1	0,3159			
2	0,3173			
3	0,3339			
4	0,3161			
5	0,3213	0,3209	1,9552	97,76%
vial 2				
1	0,3331			
2	0,3390			
3	0,3157			
4	0,3150			
5	0,3303	0,3266	1,9901	99,50%
vial 3				
1	0,3131			
2	0,3164			
3	0,3383			
4	0,3124			
5	0,3153	0,3191	1,9442	97,21%
		conc media	1,9631	98,16%
		des est.	0,0195	
		c.v.	1,00%	

Tabla 27: valores espectrofotométricos al cabo de 1 mes a 40 ° C.

Valores al cabo de 3 meses

Barrido entre 190 y 400 nm de λ .

tª 40 ° c	
λ	absorbancias
285	0,126
261	0,118
230	0,343

Tabla 28: barrido espectrofotométrico a tiempo = 3 meses en condiciones aceleradas a 40 ° C.

Valores de concentración

datos a 230 nm				
vial 4	absorbancias	promedio	concentración $\mu\text{g/ml}$	% recuperación
1	0,3436			
2	0,3387			
3	0,3379			
4	0,3409			
5	0,3419	0,3406	2,0754	103,77%
vial 5				
1	0,3291			
	0,3220			
3	0,3241			
4	0,3210			
5	0,3210	0,3234	1,9707	98,53%
vial 6				
1	0,3469			
2	0,3543			
3	0,3437			
4	0,3320			
5	0,3320	0,3418	2,0826	104,13%
		conc media	2,0429	102,15%
		des est.	0,0511	
		c.v.	2,50%	

Tabla 29: valores espectrofotométricos al cabo de 3 meses a 40 ° C.

Valores al cabo de 6 meses

Barrido entre 190 y 400 nm de λ .

t^a 40 ° c	
λ	absorbancias
285	0,145
261	0,132
230	0,317

Tabla 30: barrido espectrofotométrico a tiempo = 6 meses en condiciones aceleradas a 40 ° C.

Valores de concentración

datos a 230 nm				
vial 9	absorbancias	promedio	concentración $\mu\text{g/ml}$	% recuperación
1	0,3186			
2	0,3193			
3	0,3214			
4	0,3227			
5	0,3211	0,3206	1,9534	97,67%
vial 10				
1	0,3139			
2	0,3116			
3	0,3154			
4	0,3150			
5	0,3154	0,3143	1,9146	95,73%
vial 11				
1	0,3141			
2	0,3119			
3	0,3129			
4	0,3177			
5	0,3150	0,3143	1,9150	95,75%
		conc media	1,9277	96,38%
		des est.	0,0182	
		c.v.	0,95%	

Tabla 31: valores espectrofotométricos al cabo de 6 meses a 40 ° C.

Valores al cabo de 12 meses

Barrido entre 190 y 400 nm de λ .

tª 40 ° c	
λ	absorbancias
285	0,121
261,5	0,105
230	0,318

Tabla 32: barrido espectrofotométrico a tiempo = 12 meses a 25 °C

Valores de concentración

datos a 230 nm				
vial 13	absorbancias	promedio	concentración $\mu\text{g/ml}$	% recuperación
1	0,3386			
2	0,3249			
3	0,3276			
4	0,3220			
5	0,3249	0,3276	1,9961	99,80%
vial 15				
1	0,3260			
2	0,3091			
3	0,3183			
4	0,3169			
5	0,3210	0,3183	1,9390	96,95%
vial 16				
1	0,3363			
2	0,3326			
3	0,3300			
4	0,3296			
5	0,3350	0,3327	2,0272	101,36%
		conc media	1,9874	99,37%
		des est.	0,036504486	
		c.v.	1,84%	

Tabla 33: valores espectrofotométricos al cabo de 12 meses a 40 ° C.

En el estudio en condiciones aceleradas se ha evaluado la concentración de minoxidil de las muestras almacenadas a 40 °C a diferentes tiempos, al cabo de 1, 3, 6 y 12 meses.

Con respecto al barrido espectral, al igual que en el estudio a largo plazo no se han obtenido picos de absorción máximos diferentes a 230 nm, en ninguno de los intervalos de tiempo analizados. De la misma forma las concentraciones obtenidas están todas comprendidas entre el 95 y el 105% con unos coeficientes de variación también inferiores al 5%.

4.13. ESTABILIDAD EN CONDICIONES INTERMEDIAS

Si durante los 6 meses de almacenamiento en condiciones aceleradas, se detecta un “cambio significativo” en el principio activo o medicamento, se ha de realizar un estudio adicional en condiciones intermedias. En este tipo de estudio las muestras se almacenan a una temperatura constante de $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y a una humedad relativa ambiental constante del $65\% \pm 5\%$ (9).

Los “cambios significativos” a condiciones aceleradas se definen como:

1º Una pérdida de potencia de un 5% en el ensayo de riqueza del lote.

2º Cualquier producto de degradación que esté fuera de los límites especificados.

3º El producto está fuera de límite del pH.

4º Las especificaciones del ensayo de disolución están fuera del límite para 12 cápsulas o comprimidos.

En nuestro estudio se tendrá en cuenta el primer punto dadas las características de la formulación ensayada.

Como ya se ha mencionado se repetirán y añadirán ensayos adicionales en condiciones intermedias si hubiera ocurrido un cambio significativo en el ensayo acelerado. En nuestro caso los datos obtenidos por espectrofotometría no arrojaron ningún valor por debajo del 95% de potencia en los datos analizados en condiciones aceleradas. No obstante se realizaron por rutina y para aportar una mayor evidencia de datos experimentales los análisis espectrofotométricos obtenidos en los viales almacenados en condiciones intermedias, $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$

4.14. RESULTADOS EN CONDICIONES INTERMEDIAS

Los datos obtenidos se muestran a continuación

Valores al cabo de 3 meses

Barrido entre 190 y 400 nm de λ .

tª 30 ° c	
λ	absorbancias
285	0,123
262	0,112
230	0,338

Tabla 34: barrido espectrofotométrico a tiempo = 3 meses en condiciones intermedias a 30° C.

Valores de concentración

datos a 230 nm				
vial 1	absorbancias	promedio	concentración $\mu\text{g/ml}$	% recuperación
1	0,3344			
2	0,3386			
3	0,3347			
4	0,3404			
5	0,3317	0,3360	2,0471	102,36%
vial 2				
1	0,3380			
2	0,3370			
3	0,3386			
4	0,3354			
5	0,3351	0,3368	2,0524	102,62%
vial 3				
1	0,3261			
2	0,3187			
3	0,3187			
4	0,3176			
5	0,3176	0,3197	1,9481	97,40%
		conc media	2,0158	100,79%
		des est.	0,0479	
		c.v.	2,38%	

Tabla 35: valores espectrofotométricos al cabo de 3 meses a 30 ° C.

Valores al cabo de 6 meses

Barrido entre 190 y 400 nm de λ .

tª 30 ° c	
λ	absorbancias
286	0,140
262,5	0,128
230	0,339

Tabla 36: barrido espectrofotométrico a tiempo = 6 meses en condiciones intermedias a 30° C

Valores de concentración

datos a 230 nm				
vial 4	absorbancias	promedio	concentración $\mu\text{g/ml}$	% recuperación
1	0,3196			
2	0,3219			
3	0,3373			
4	0,3191			
5	0,3259	0,3248	1,9787	98,94%
vial 5				
1	0,3316			
2	0,3337			
3	0,3264			
4	0,3184			
5	0,3250	0,3270	1,9925	99,63%
		conc media	1,9856	99,28%
		des est.	0,00689891	
		c.v.	0,35%	

Tabla 37: valores espectrofotométricos al cabo de 6 meses a 30 ° C.

En el estudio de condiciones intermedias se ha evaluado la concentración de minoxidil de las muestras almacenadas a 30 °C al cabo de tres y seis meses de almacenamiento.

Con respecto al barrido espectral, al igual que en los estudios a largo plazo y en condiciones aceleradas no se han obtenido picos de absorción máximos diferentes a 230 nm, en ninguno de los intervalos de tiempo analizados. De la misma forma las concentraciones obtenidas están todas

comprendidas entre el 95 y el 105% con unos coeficientes de variación también inferiores al 5%.

A la vista de los datos en los tres tipos de estudios de estabilidad, se puede concluir que el minoxidil permanece estable cuando se almacena a diferentes temperaturas. Aunque más adelante realizaremos un análisis estadístico que complete el estudio y dilucide si hay diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes temperaturas de almacenamiento.

4.15. ESTUDIO MICROBIOLÓGICO

La mayoría de los materiales de partida y, por tanto, los preparados farmacéuticos que los contienen, mantienen la vida de algunos microorganismos. Aunque esta capacidad es muy variable y depende de las propiedades nutritivas y del contenido en humedad de cada producto, no es prudente suponer que, por ejemplo, un polvo seco o un comprimido están a salvo de la contaminación microbiana (47).

En nuestro caso partimos de materiales de laboratorio habituales en una oficina de farmacia, como material de vidrio, matraces, probetas, etc....utillaje que no ha sido esterilizado previamente e instalaciones que tampoco aseguran una atmósfera y condiciones libres de contaminación microbiana. Además las posibilidades de que los microorganismos penetren en los medicamentos durante su elaboración y uso son considerables, no hay que olvidar que los preparados se acondicionan en varios envases, por lo que no debe sorprender que al hacer un estudio de detección de contaminación microbiana en preparados no estériles y sus ingredientes se encuentren siempre microorganismos. Hay que tener en cuenta en el caso del minoxidil que se trata de una solución donde existe un alto porcentaje de alcohol de 96° (70 % v/v) y de sobra es conocida la capacidad desinfectante de este preparado (48). Por todo ello se piensa que es importante conocer el contenido microbiano de estos preparados objeto de estudio.

Se considera necesario, por lo tanto, realizar un estudio microbiológico y determinar el recuento de microorganismos aerobios viables totales en las muestras, siguiendo el método de la RFE (49). Como se explica en la RFE, las preparaciones farmacéuticas que no requieren esterilidad deben ajustarse a unos criterios que garanticen su calidad microbiológica. Por esta razón es necesario realizar en estos productos el recuento de bacterias aerobias viables y de hongos (50).

Se utiliza el método de filtración ya que este método puede ser utilizado para compuestos líquidos o sólidos que sean solubles. En nuestro caso partimos de una solución de minoxidil al 2%. Este método además tiene la ventaja de permitir la eliminación de agentes antimicrobianos fuertemente activos como es el alcohol de 96°.

Técnica:

Se parte de 3 muestras de solución de minoxidil al 2% de 250 ml cada una, envasadas en envase de vidrio topacio. Seguidamente se realizan dos tomas de muestra de cada envase, una de 1 ml que se diluye hasta 10 ml con el diluyente (solución de peptona y cloruro sódico) y otra de 10 ml de solución de minoxidil para cada uno de los medios de cultivo que serán:

- Agar caseína-soja o Agar Triptófano-soja (para recuento de bacterias viables)
- Agar glucosa de Sabouraud (para recuento de mohos y levaduras)

Cada dilución se añade sobre el filtro colocado en el equipo de filtración. Después de filtrar se lava cada filtro con el mismo diluyente tres veces. Para retirar el filtro se desmonta el equipo y con unas pinzas estériles se deposita el filtro sobre la placa del medio de cultivo correspondiente. La membrana del filtro se coloca de manera que la cuadrícula quede en la parte superior, cuidando que no queden bolsas de aire que impidan un buen contacto con el medio de cultivo.

Como testigos se dispone de una placa sólo con medio de cultivo, para realizar el control del medio y otra placa como testigo del filtro, del aparato de filtración y del líquido de lavado (diluyente). En ninguna de estas dos placas deberá aparecer crecimiento de colonias después de la incubación.

Se incuban a 30 – 35 °C durante 48 – 72 horas para las bacterias y a 20 – 25 °C durante 5 días para los hongos.

El esquema final de muestras se representa en la siguiente tabla:

Muestra de Minoxidil	Medio de cultivo para bacterias	Medio de cultivo para hongos
Nº1 (Dilución 1/10)	Agar Triptófano-Soja	Agar Sabouraud
Nº1 (10 ml)	Agar Triptófano-Soja	Agar Sabouraud
Nº2 (Dilución 1/10)	Agar Triptófano-Soja	Agar Sabouraud
Nº2 (10 ml)	Agar Triptófano-Soja	Agar Sabouraud
Nº3 (Dilución 1/10)	Agar Triptófano-Soja	Agar Sabouraud
Nº3 (10 ml)	Agar Triptófano-Soja	Agar Sabouraud

Tabla 38: muestras en control microbiológico

Después de incubar se cuenta el número de UFC (unidades formadoras de colonias)/ml obtenidas.

Esquema del proceso:

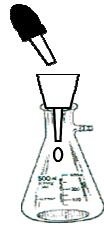
Preparación de la muestra

- Dilución con disolvente



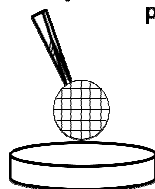
Filtración por membrana

- Bacterias



Sistema de filtración con membrana
de 0,45 μm \varnothing poro

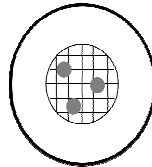
↓ Lavado con solución tamponada de
peptona pH = 7



Placa de Agar caseína-soja o
triptona de soja

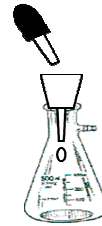
Incubación a 30 – 35 °C (48-72 h)

Recuento de UFC



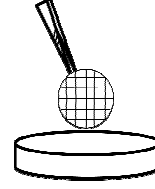
Filtración por membrana

- Hongos



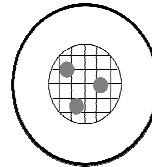
Sistema de filtración con membrana
de 0,45 μm \varnothing poro

↓ Lavado con solución tamponada de
peptona pH = 7



Placa de Agar GS

Incubación a 20 - 25 °C (5 – 7) días



Periodicidad de las determinaciones:

Este proceso se realizó en los siguientes intervalos de tiempo:

Tiempo 0 y al cabo de 1, 3, 6 y 12 meses en el caso del minoxidil.

4.16. RESULTADOS ESTUDIO MICROBIOLÓGICO.

Las soluciones de minoxidil al 2% preparadas según se describe en el Formulario Nacional (10), envasadas en frascos de vidrio topacio y conservadas a las temperaturas establecidas por la RFE, no presentaron ningún crecimiento bacteriano ni de hongos significativo en ninguno de los períodos evaluados, según se describe en las tablas 39 y 40.

Medio cultivo bacterias (*Agar – Triptófano Soja*)

Muestra	Tiempo 0	1 mes	3 meses	6 meses	12 meses
Nº1 (1/10 ml)	0 ufc				
Nº1 (10 ml)	0 ufc	0 ufc	0 ufc	0 ufc	2-3 ufc
Nº2 (1/10 ml)	0 ufc				
Nº2 (10 ml)	0 ufc	0 ufc	0 ufc	0 ufc	0 ufc
Nº3 (1/10 ml)	0 ufc				
Nº3 (10 ml)	0 ufc	0 ufc	0 ufc	2 ufc	0 ufc
Control					
Medio	0 ufc	0 ufc	0 ufc	0 ufc	0 ufc
Control					
Diluyente	0 ufc	0 ufc	0 ufc	0 ufc	0 ufc

Tabla 39: ufc/ml tras el período de incubación. Medio de cultivo para bacterias.

Se observa que a tiempo 0 no hubo crecimiento en ninguna de las muestras ni de dilución 1/10 ml ni en las de 10 ml, por lo que en los siguientes tiempos de medición sólo se hicieron los cultivos en las muestras sin diluir de 10 ml para evitar costes innecesarios.

Medio cultivo hongos (*Agar Sabouraud*)

Muestra	Tiempo 0	1 mes	3 meses	6 meses	12 meses
Nº1 (1/10 ml)	0 ufc				
Nº1 (10 ml)	0 ufc	0 ufc	0 ufc	0 ufc	2-3 ufc
Nº2 (1/10 ml)	0 ufc				
Nº2 (10 ml)	0 ufc	0 ufc	0 ufc	0 ufc	0 ufc
Nº3 (1/10 ml)	0 ufc				
Nº3 (10 ml)	0 ufc	0 ufc	0 ufc	2 ufc	0 ufc
Control					
Medio	0 ufc	0 ufc	0 ufc	0 ufc	0 ufc
Control					
Diluyente	0 ufc	0 ufc	0 ufc	0 ufc	2 ufc

Tabla 40: ufc/ml tras el período de incubación. Medio de cultivo para hongos.

En el caso de los hongos se procedió de igual manera con las diluciones, es decir sólo se cultivaron a partir de tiempo 1 mes las muestras de 10 ml sin diluir, aún así como se puede observar no hubo crecimiento significativo de ninguna colonia.

Cultivos a los 6 meses:



Foto 1: placa de muestra 3 de minoxidil 10 ml después de un período de incubación de 6 meses en Agar Triptófano Soja. Se observan 2 ufc señaladas con un círculo rojo (cocos gram + tipo micrococcus pigmento amarillo).

Cultivos a los 12 meses:

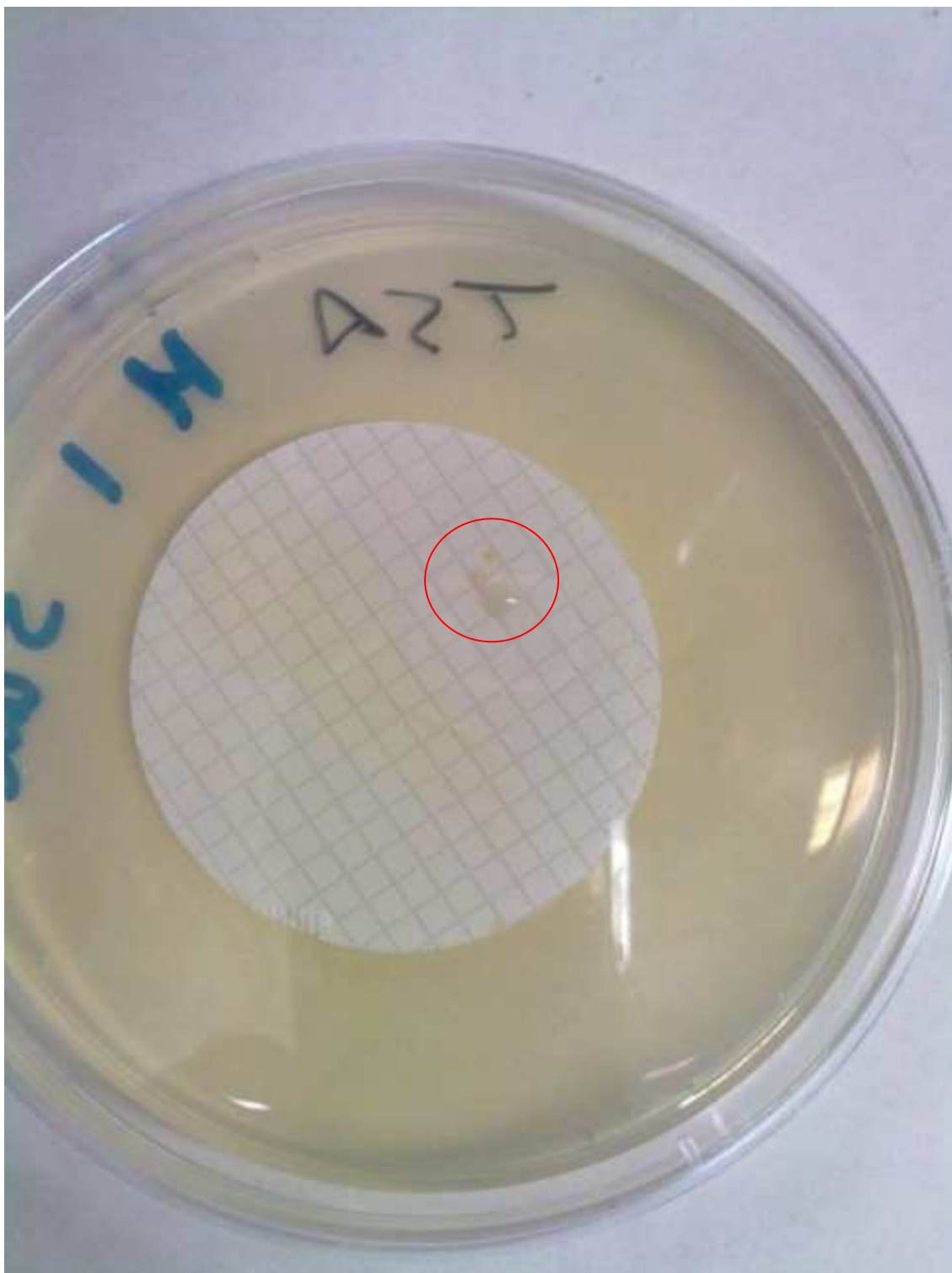


Foto 2: placa de muestra 1 de minoxidil 10 ml después de un período de incubación de 12 meses. Medio Agar Triptófano-Soja. Se observan de 2 – 3 ufc contenidas en un círculo rojo.



Foto 3: placa de muestra control diluyente después de un período de incubación de 12 meses. Medio Agar Triptófano-Soja. Se observan de 2 ufc.

Las dos colonias observadas en el control diluyente al cabo de 12 meses de incubación es posible que sean debidas a una posible contaminación por las pinzas durante la manipulación del filtro.

DISCUSIÓN

Potencia.

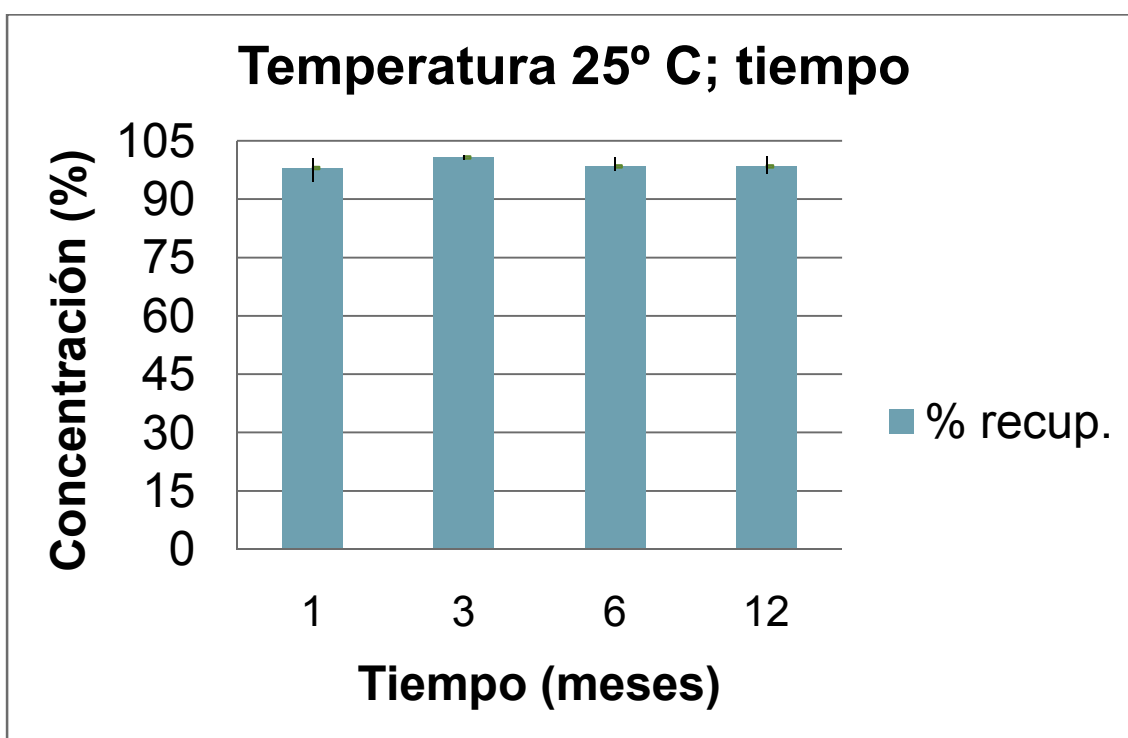
En la norma del ICH, CPMP/QWP/122/02, se marcan los valores límites generales del 95 al 105% (45), como valores límite aceptables de potencia.

Durante los 12 meses que ha durado el estudio no se han encontrado valores de potencia que estén fuera de estos límites de aceptación. En la tabla 41 se muestran los valores del porcentaje de recuperación obtenidos a tiempo 0, al mes, a los 3 meses, a los 6 meses y al año después de la elaboración del lote del producto preparado, minoxidil 2% en solución hidroalcohólica. Los valores del porcentaje de recuperación se obtuvieron según la recta de regresión previamente calculada y validada como método fiable de determinación.

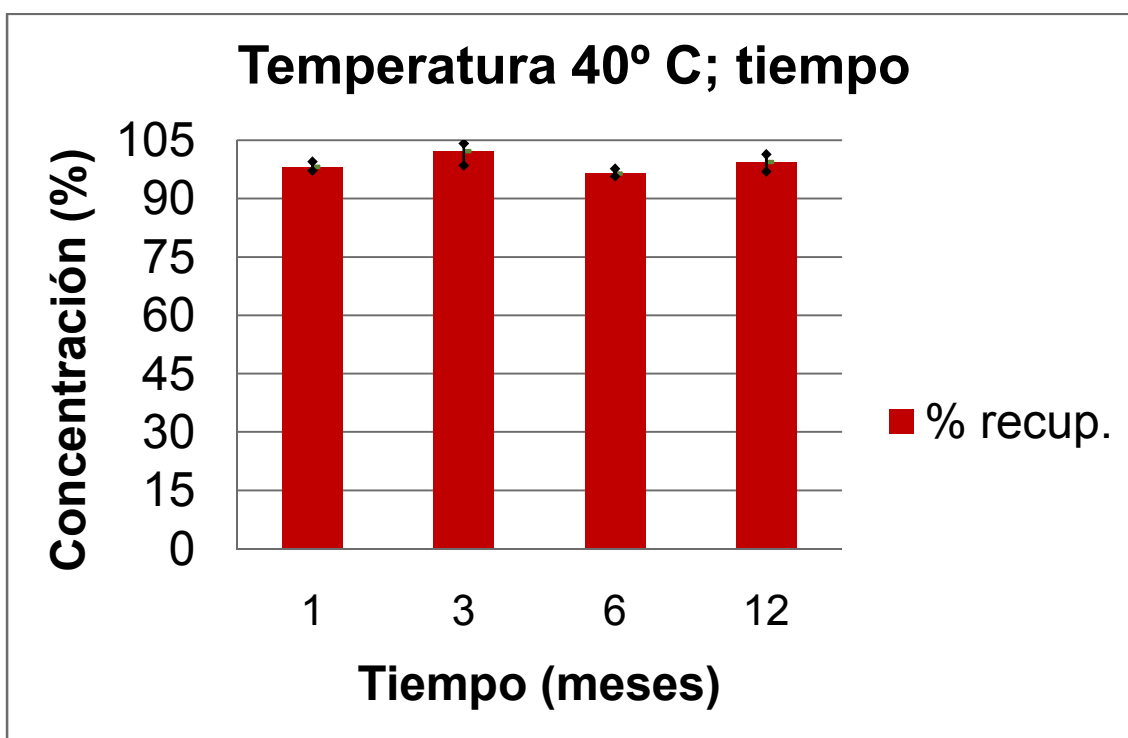
	tiempo 0	1 mes		3 meses		6 meses		12 meses	
		25 °C	40 °C	25 °C	40 °C	25 °C	40 °C	25 °C	40 °C
% recuperación	99,99%	97,95%	98,16%	100,69%	102,15%	98,38%	96,38%	98,31%	99,37%
C.V.	2,36%	2,66%	1,00%	0,44%	2,50%	1,68%	0,95%	1,92%	1,84%

Tabla 41: porcentajes de concentración a lo largo del estudio y valores del coeficiente de variación (C.V.)

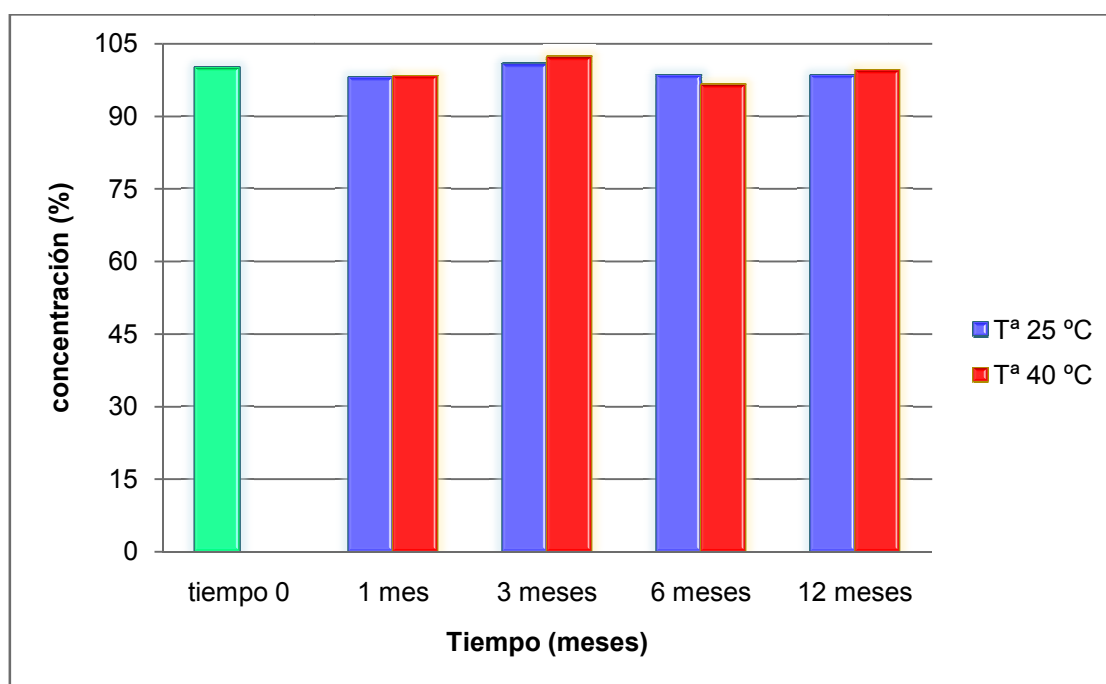
A continuación se muestran las gráficas de porcentajes de recuperación en concentración según temperatura de almacenamiento y evolución en el tiempo. Como se puede comprobar los datos de concentración están dentro de los límites de riqueza aceptables de $\pm 5\%$, según criterio general actual de la Unión Europea. Además el coeficiente de variación es también inferior al 5%, lo que nos ofrece mayor fiabilidad de los datos obtenidos. Esto es así tanto para los viales almacenados a largo plazo a 25° C de temperatura como para los almacenados en condiciones aceleradas a 40° C.



Gráfica 5: Valores de concentración de minoxidil de los viales almacenados a 25° C durante los intervalos de tiempo marcados.



Gráfica 6: Valores de concentración de minoxidil de los viales almacenados a 40° C durante los intervalos de tiempo marcados.



Gráfica 7: Datos comparativos de los valores de concentración de minoxidil a 25 y 40°C

No obstante aunque los valores de riqueza no superan el intervalo del $\pm 5\%$ es conveniente hacer un estudio estadístico comparativo para saber si se mantiene la hipótesis nula, es decir los valores a diferentes temperaturas no muestran diferencias estadísticamente significativas.

Para ello recurrimos a un estudio de comparación de varias muestras:

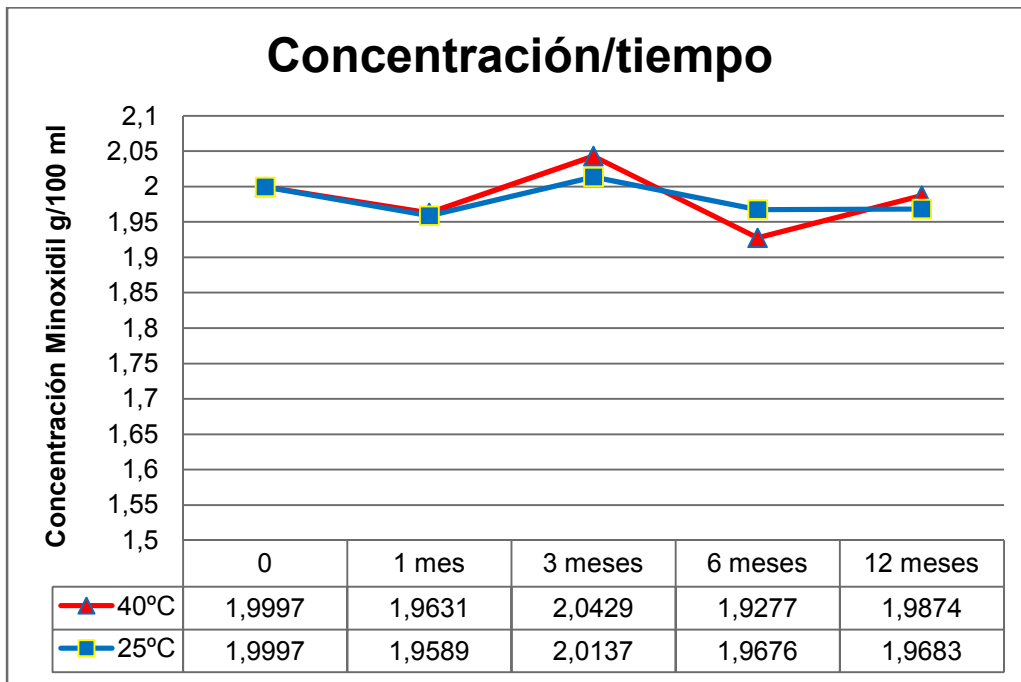
Resumen del Procedimiento.

Muestra 1: viales de minoxidil almacenados a 25°C

Muestra 2: viales de minoxidil almacenados a 40°C

Muestra 1: tiene 5 valores comprendidos entre 1,9589 hasta 2,0137

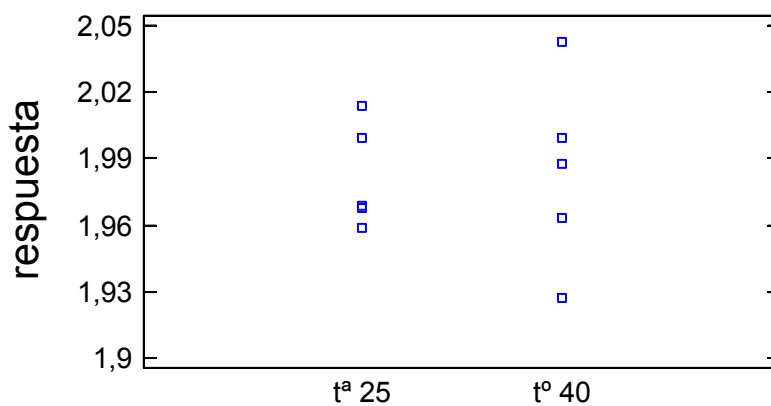
Muestra 2: tiene 5 valores comprendidos entre 1,9277 hasta 2,0429



Gráfica 8: Valores de concentración a lo largo del tiempo de los viales almacenados a diferentes temperaturas.

Este procedimiento compara los datos en 2 columnas de los valores de concentración a temperatura de 25 °C con los valores de concentración a temperatura de 40 °C según se ha expuesto en el resumen del procedimiento y los datos que aparecen en la gráfica 9, realizando varios test estadísticos y gráficos para comparar las muestras. El F-test en la tabla de ANOVA comprobará si hay alguna diferencia significativa entre las medias.

Gráfico de Dispersión según Muestra

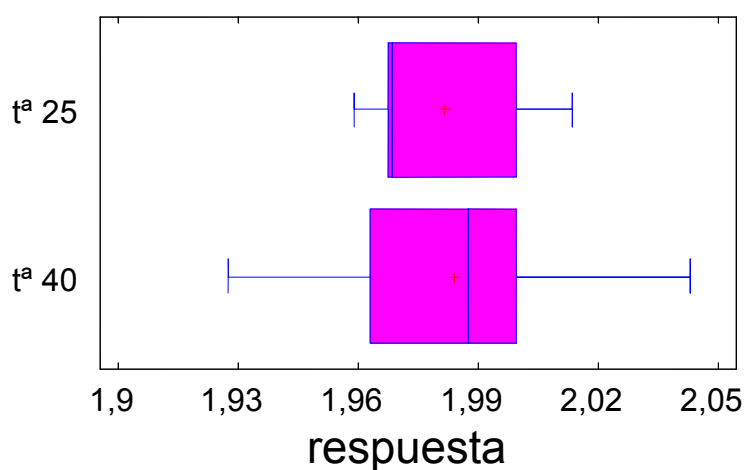


Gráfica 9: dispersión de las muestras 1 y 2.

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente-F	p-Valor
Entre grupos	0,000016	1	0,000016	0,0132	0,9112
Intra grupos	0,009579	8	0,001197		
Total (Corr.)	0,009595	9			

Tabla 42: Datos del Análisis de la varianza

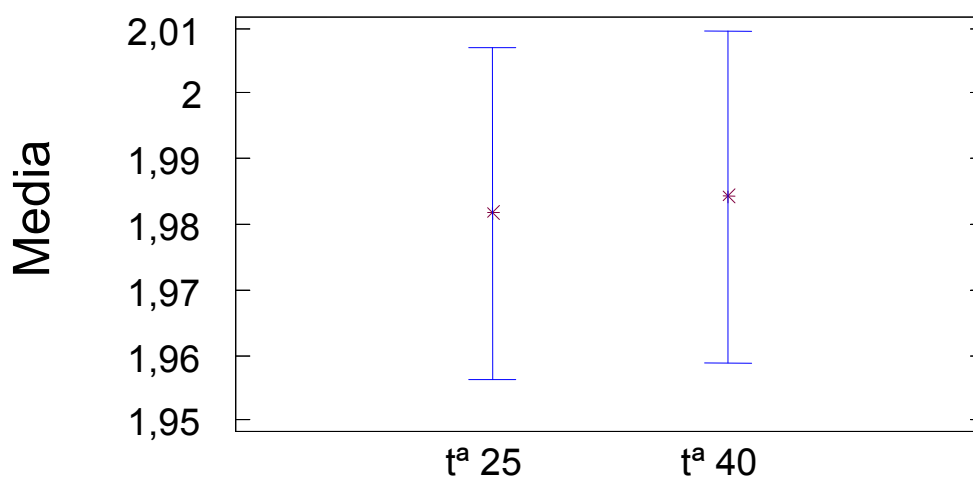
La tabla 42 descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro de cada grupo. El F-ratio, que en este caso es igual a 0,0132, es el cociente de la estimación entre grupos y la estimación dentro de los grupos. Puesto que el p-valor del test F es superior o igual a 0,05, no hay diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 2 variables a un 95%.

**Gráfica 10:** Gráfica de cajas y bigotes de los datos

	Frecuencia	Media	Error estándar	Límite inferior	Límite superior
Tª 40°C	5	1,9816	0,01547	1,9564	2,006
Tª 25°C	5	1,9841	0,01547	1,9589	2,009
Total	10	1,9829			

Tabla 43: medias con 95 intervalos LSD (menores diferencias significativas)

Esta tabla 43 muestra la media para cada columna de datos. También muestra el error estándar de cada media, que es la medida de su variabilidad en la muestra. El error estándar es el resultado de dividir la desviación típica agrupada por la raíz cuadrada del número de observaciones en cada nivel. La tabla también muestra un intervalo que incluye cada media. Los intervalos mostrados actualmente se basan en el procedimiento de las menores diferencias significativas de Fisher (LSD) (ver gráfica 11). Se construyen de tal manera que si dos medias son iguales, sus intervalos se solaparán el 95% de las veces.



Gráfica 11: Menores diferencias significativas LSD

Por último se realizó también el test de Kruskal-Wallis que prueba la hipótesis nula de igualdad de las medianas dentro de cada una de las 2 columnas. Los datos de todas las columnas primero se combinan y se ordenan de menor a mayor. Entonces se calcula el rango medio para los datos en cada columna. Puesto que el p-valor es superior o igual a 0,05, no hay diferencia estadísticamente significativa entre las medianas a un nivel de confianza del 95%.

	Tamaño muestral	Rango medio
T ^a 25°C	5	5,5
T ^a 40°C	5	5,5

Estadístico = 0,0 P-valor = 1

Tabla 44: Test de Kruskal-Wallis

Por lo tanto no se observan diferencias estadísticamente significativas entre los viales almacenados a largo plazo (25° ± 2° C) y los almacenados en condiciones aceleradas (40° ± 2° C) en cuanto a potencia.

Estudio microbiológico:

Las soluciones de minoxidil preparadas con la solución hidroalcohólica a las proporciones que marca el Formulario Nacional y envasadas en frascos de cristal topacio y almacenadas a 30 – 35 °C durante 48 – 72 horas para las bacterias y a 20 – 25 °C durante 5 días para los hongos, no presentan crecimiento bacteriano ni de hongos significativo en ninguno de los períodos de tiempo evaluados.

CAPÍTULO II.

SOLUCIÓN DE SULFATO DE COBRE AL 0,1 %

INTRODUCCIÓN

La solución de sulfato de cobre al 0,1% se recoge como preparado oficial en el Formulario Nacional en la primera edición del año 2003 (51). Es un producto usado tradicionalmente en la oficina de farmacia desde tiempos inmemoriales. Tampoco hay estudios publicados sobre la estabilidad del sulfato de cobre en solución acuosa al 0,1%. Este preparado oficial se prepara a partir del sulfato de cobre pentahidratado.

El plazo de validez que se establece en el FN es de tres semanas. En otras publicaciones (17) se establece como período de validez para las soluciones de uso externo en general sin conservante un plazo de 2 semanas y para las soluciones de uso externo con conservante 6 meses. (1 y 52).

El sulfato de cobre lleva muchos años utilizándose como preparado oficial, antes de su aparición en el Formulario Nacional ya se recoge en todas las publicaciones sobre formulación magistral anteriores. (52, 53, 54).

El sulfato de cobre se ha empleado también como fungicida y es el componente principal de la mezcla de Burdeos. (55).

En resumen el origen del sulfato de cobre es muy antiguo y no se podría precisar con exactitud cuándo comenzó a utilizarse como preparado farmacéutico.

PARTE TEÓRICA

1. FARMACOLOGÍA

1.1. ACCIÓN TERAPÉUTICA

El cobre es un elemento traza esencial y sus sales se utilizan como fuente de cobre para el tratamiento de deficiencias de este catión, aunque son raras en humanos. Se administran las sales generalmente en nutrición parenteral, en dosis iniciales de 5 mg/día, equivalentes a unos 1,25 mg de cobre elemental y unas dosis de mantenimiento de 1,6 mg/día, lo que equivale aproximadamente a 0,4 mg de cobre elemental. Las disoluciones al 0,1% se emplean para lavado gástrico en el envenenamiento por fósforo, debiendo retirarse rápidamente para evitar la intoxicación por cobre. Externamente se aplica en soluciones al 1% para quemaduras cutáneas por fósforo. (56)

Por vía tópica tiene acción astringente, fungicida y antiséptica, usándose en concentraciones del 0,1 al 0,5 %, en el tratamiento de eczemas, impétigo, ulceraciones, piodermitis, dermatomicosis, sobre todo en casos de pie de atleta y del herpes simple. Las soluciones concentradas o el empleo directo de la sustancia en forma de lápices actúan como cáusticos, utilizándose en la terapia de verrugas, tracoma, úlceras tórpidas, chancro blando y otros casos análogos. Se administra en forma de soluciones, pomadas y cremas al 0,1 – 0,5% y lápices cáusticos y papelillos de 1 g para disolver en un litro de agua. (53 y 57) También se emplea en la conjuntivitis, blenorragia, gonorrea y leucorrea.

El sulfato de cobre también se emplea en concentraciones de 0,5 a 1 ppm para prevenir el crecimiento de algas en estanques, piscinas y peceras, siendo así mismo un molusquicida, utilizándose a concentraciones de 5 ppm en el control de caracoles para evitar que contaminen las aguas potables, ya que estos son vectores de parasitosis tales como esquistosomiasis y fascioliasis.

En formulación magistral se emplea de diferentes maneras y en diferentes formas farmacéuticas, como por ejemplo, agua de Alibour, pasta de

Alibour, papelillos para hiperhidrosis plantar, pomada de sulfato de cobre, colirio de sulfato de cobre, glicerolado cúprico, etc.

1.2. INDICACIONES

La solución de sulfato de cobre al 0,1% tiene como principal indicación por su acción astringente, antiséptica y antifúngica el tratamiento de eczemas, impétigo, ulceraciones, piodermitis, dermatomicosis, sobre todo en casos de pie de atleta y del herpes simple, como ya se ha comentado. En oficina de farmacia el uso más frecuente es el tratamiento del herpes simple.

1.3. POSOLOGÍA

La dosis recomendada según el Formulario Nacional para la solución de sulfato de cobre al 0,1% es la aplicación el producto en la zona afectada unas 3 a 4 veces al día (11), aunque en otras publicaciones se deja a criterio médico el establecimiento de la posología (58).

1.4. PRECAUCIONES

El cobre y sus sales no deben utilizarse en pacientes con degeneración hepatolenticular.

1.5. REACCIONES ADVERSAS

La ingestión de grandes cantidades de sulfato de cobre provoca rápidamente náuseas y vómitos, gusto metálico y sensación de quemazón en el esófago y estómago. Aparece cólico y diarrea sanguinolenta, con convulsiones, hipotensión y coma. Puede ocasionar daño renal con necrosis aguda de riñón e ictericia asociada con lesión hepática y hemólisis. (57).

Debido a su efecto emético, el envenenamiento fatal se produce raramente, pero se han dado casos de muerte tras la ingestión de cantidades tan pequeñas como 1 g. (57).

1.6. CONTRAINDICACIONES

Hasta el momento no se han descrito las posibles contraindicaciones del sulfato de cobre en solución al 0,1%. (11).

1.7. INTERACCIONES CON OTROS MEDICAMENTOS

Tampoco hay descritas ningún tipo de interacciones hasta este momento con este preparado oficial (11).

1.8. ADVERTENCIAS Y CONSEJOS

La solución de sulfato de cobre al 0,1 % tiene descritas las siguientes advertencias en el Formulario Nacional:

Embarazo y lactancia: no debe utilizarse durante el embarazo y la lactancia sin consultar con el médico.

Efectos sobre la capacidad de conducción: hasta el momento no se han descrito los posibles efectos de este medicamento

Otras: en caso de ingestión accidental puede producir alteraciones gastrointestinales.

2. DATOS FÍSICO-QUÍMICOS

2.1. N° CAS

El sulfato de cobre está descrito en las farmacopeas más habituales. El número CAS, Código del Chemical Abstracts Service del sulfato de cobre es el 7758-98-7. Su número RTECS (*Registry of Toxic Effects of Chemical Substances*) es GL8800000.

2.2. ESTRUCTURA QUÍMICA

El sulfato de cobre se presenta habitualmente en la forma pentahidratada.

Fórmula molecular: $\text{SO}_4\text{Cu} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Tiene un peso molecular de 249,7.



Figura 2. Sulfato de cobre

PM = 249,71

Sinonimias

Cupri sulfas. Caparrosa azul. Piedra lipis. Piedra azul. Sulfato cúprico. Vitriolo de Chipre. Vitriolo de cobre. Vitriolo azul.

2.3. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS

El sulfato de cobre pentahidratado contiene no menos del 99,0 por ciento ni más del equivalente al 101,0 por ciento de $\text{SO}_4\text{Cu} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. (56)

El sulfato de cobre pentahidratado es un polvo cristalino, de color azul o cristales azules transparentes, algo eflorescentes al aire seco, inodoro o casi inodoro y de sabor metálico desagradable.

Tiene una densidad de $2,3 \text{ g/cm}^3$.

Es soluble en tres partes de agua, 0,5 partes de agua hirviendo, 3 partes de glicerina y 500 partes de alcohol. Una solución acuosa al 5 % tiene un pH de 3,8.

Es incompatible con sulfuros solubles, ácido tánico, bórax, álcalis y fosfatos, ya que se producen precipitados de cobre insolubles. (57)

Se debe almacenar en recipientes herméticamente cerrados.

2.4. ESTABILIDAD Y ALMACENAMIENTO

El sulfato de cobre es un producto estable a temperatura ambiente. Al menos 5 años según el certificado de análisis.

Conforme al Formulario Nacional la solución acuosa de sulfato de cobre al 0,1% tiene un plazo de validez de 3 semanas. Según las Monografías Farmacéuticas del Colegio de Alicante (57) las soluciones acuosas presentan una caducidad de 7 días.

2.5. REACCIONES DE IDENTIFICACIÓN

La RFE establece tres métodos para identificar al Sulfato de cobre pentahidratado (56).

1. Añadir varias gotas de amoníaco diluido R2 a 1 ml de disolución S. El precipitado azul que se forma inicialmente al añadir el amoníaco diluido R2 se disuelve y genera un color azul oscuro.
2. Debe satisfacer el ensayo de pérdida por desecación:
3. Diluir 1 ml de disolución S hasta 5 ml con agua R. La disolución da la reacción de sulfatos.

Los ensayos que se establecen en la RFE son los siguientes:

Disolución S: 5 g de la sustancia a examinar en agua R diluida hasta 100 ml

Aspecto de la disolución: La disolución S es límpida.

Cloruros: límite de 100 ppm.

Hierro: menos de 100 ppm de Fe, determinado mediante espectrofotometría de absorción atómica.

Plomo: no más de 50 ppm de Pb, determinado mediante espectrofotometría de absorción atómica.

Pérdida por desecación: Del 35,0 por ciento al 36,5 por ciento, determinada en 0,500 g mediante desecación en estufa a 250° C

Métodos de valoración:

En la RFE se recoge un método de valoración por Yodometría (56):

Se disuelven 0,200 g de la sustancia a examinar en 50 ml de agua R. Añadir 2 ml de ácido sulfúrico R y 3 g de ioduro de potasio R. Valorar con tiosulfato de sodio 0,1 M, añadiendo 1 ml de disolución de almidón R hacia el final de la valoración.

1 ml de tiosulfato de sodio 0,1 M equivale a 24,97 mg de $\text{SO}_4\text{Cu} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

2.6. MÉTODOS DE ANÁLISIS

2.6.1. MÉTODOS DE ABSORCIÓN ATÓMICA

La espectrofotometría de absorción atómica es un método muy sensible para la determinación de los metales o elementos metaloides. Aunque existen otros métodos como hemos visto anteriormente (Yodometría) para valorar el sulfato de cobre, en este estudio se utiliza la absorción atómica para la determinación de cobre por disponer de la tecnología y ser un método más rápido, muy fiable y que proporciona un 100% de selectividad.

PARTE EXPERIMENTAL

3. MATERIALES

3.1. MATERIAS PRIMAS

Sulfato de cobre pentahidratado. Laboratorio Fagron Ibérica S.A.U.

3.2. CERTIFICADO DE ANÁLISIS

En el caso de la materia prima sulfato de cobre pentahidratado, se han tomado como referencia las especificaciones establecidas en la PhE por ende en la RFE monografía 894.

En cuanto a riqueza el sulfato de cobre pentahidratado contiene no menos del 99 por ciento ni más del equivalente al 101,0 por ciento de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

Sus características físicas ya han sido descritas en el punto anterior.

Nuestro producto tiene como proveedor a la compañía Fagron que aporta el siguiente certificado de análisis:

FAGRON IBERICA S.A.U · JOSEP TAPIOLAS,150 · ES-08226 TERRASSA · BARCELONA
Tel 937310722
Fax 937311644
www.fagron.es

Pg. 3
15. Septiembre 2010

Certificado de Análisis

SULFATO DE COBRE 5-Hdtos

PM	249,70	Próximo Control Analítico	28/03/15
Nº CAS	7758-99-8	Nº Análisis	BA-08287
NºProducto	3044-00	Nº Lote	L10070361
Fecha Conclusión	29/07/10	Cod Muestra	M-012320
		Calidad Final	PH.EUR. 6

INCI

Características Polvo cristalino azul o cristales transparentes azules. Fácilmente soluble en agua, soluble en metanol, prácticamente insoluble en alcohol.

ENSAYOS	ESPECIFICACIONES	RESULTADOS	METODO
Identificación	A #B #C	Conforme	A0130444-00
Aspecto de la disolución	Limpida	Conforme	A0230444-00
Cloruros	< 100 ppm	< 100 ppm	A1930444-00
Hierro	< 100 ppm	43 ppm	A1730444-00
Plomo	< 50 ppm	11,6 ppm	A8630444-00
Pérdida por desecación	35,0 – 36,5 %	<35,9 %	A0830444-00
Riqueza	99,0 – 101,0 %	99,9 %	A1033444-00

Conservación En envase bien cerrado.

Anna Viñas
Directora Técnica Farmacéutica

3.3. INSTRUMENTAL DE LABORATORIO

Balanza, sartorius BP 310 P

Balanza, sartorius BP 2100

Matraces aforados de vidrio de 1000 ml, 100 ml y 50 ml

Teflón de agitación

Aparato de absorción Atómica, novAA 300 analytikjena. La llama en la mezcla de gases está formada por Acetileno/Aire. Departamento de Edafología de la Facultad de Farmacia de la UCM.

Micropipeta automática Easy 40+ 0,5-5 ml (EASD-5KP-001)

Placas Petri con agar caseína-soja

Placas Petri con agar glucosa de Sabouraud

Estufa programada a 25° C
Estufa programada a 40° C
Estufa programada a 20 - 25° C
Estufa programada a 30 - 35° C
Filtros Millipore® de 0,45 µm de diámetro de poro
Aparatos de filtración estéril
Pipetas estériles de 1 ml y 10 ml
Pinzas estériles
Bomba de vacío
Tubos de ensayo de vidrio con algodón
Gradillas
Frascos de plástico valona translúcido fabricados con HDPE 35060E.
(Polietileno de alta densidad).
Frascos de vidrio de silicato de sodio tipo III.
Frascos de polietilentereftalato (Pet) transparente.
Tapones de plástico

3.4. REACTIVOS

Agua purificada. Laboratorio Fagron S.A.
Diluyente y líquido de lavado Millipore® (solución de peptona y cloruro sódico tamponada a pH 7) (33).
Solución patrón de nitrato de cobre trihidrato $1\text{g} \pm 0,002\text{ g/ litro}$ en NH_3 0,5 N de Panreac®, código 313178.

4. MÉTODOS Y RESULTADOS

4.1. CARACTERIZACIÓN DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS

Igual que en el estudio anterior se procedió a la observación directa de la materia prima para comprobar que el aspecto es el que se describe en la farmacopea o en las fuentes bibliográficas adecuadas. Se observó su apariencia externa color, textura y olor.

4.2. RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DE LOS CARACTERES ORGANOLÉPTICOS

El sulfato de cobre es un polvo cristalino de color azul o cristales azules transparentes, fácilmente solubles en agua, soluble en metanol y prácticamente insoluble en alcohol.

4.3. VALORACIÓN POR ABSORCIÓN ATÓMICA. VALIDACIÓN ANALÍTICA.

Ya hemos comentado que la espectrofotometría de absorción atómica es un método muy sensible para la determinación de los metales como es el caso del cobre. No obstante aunque en teoría, la absorción atómica debe seguir la ley de Beer con la absorbancia directamente proporcional a la concentración, desafortunadamente, con frecuencia las curvas de calibración no son lineales, así que es contraproducente realizar un análisis de absorción atómica sin confirmar de forma experimental la linealidad de la respuesta del instrumento. Por lo que se ha preparado de forma periódica una curva de calibración que abarca el intervalo de concentración en el que se encuentran las muestras (59).

Se debe garantizar también la medida de una solución estándar preparada en el momento cada vez que se realiza un análisis. De esta manera la espectrofotometría de absorción atómica se considera un ensayo específico ya que proporciona un 100% de selectividad. (60)

En este caso se ha procedido a realizar una validación del método con los mismos criterios utilizados en la espectrofotometría UV-Visible por lo que se han determinado igualmente los parámetros de:

- Linealidad (Límites de detección y confianza, para un grado de confianza del 95%).
- Sensibilidad (Límites de detección y cuantificación).
- Precisión (Repetibilidad y precisión intermedia).
- Robustez

En resumen en cada determinación en los intervalos de medición correspondientes del estudio se realizará siempre una curva, se verificará su linealidad y se utilizará un patrón elaborado en el momento como acabamos de comentar arriba. Con esto estamos asegurando la validez del método.

4.4. RESULTADOS DE LA VALORACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA

4.4.1. LINEALIDAD

La concentración del sulfato de cobre pentahidratado como preparado oficial es del 0,1%, lo que equivale a una concentración de 1 mg/ml de la sal. De este total de 1 mg sólo hay un 25,44% de cobre, dado que el peso molecular del sulfato de cobre pentahidratado es de 249,70 y el peso atómico del cobre es 63,54. La técnica de Absorción Atómica como ya hemos visto, permite determinar de forma cuantitativa la mayoría de los elementos de la tabla periódica, en este caso la del átomo de cobre. Por lo que las diferentes muestras que se prepararon tuvieron en cuenta exclusivamente la concentración de cobre como elemento independientemente de la sal en la que va contenido, en este caso el sulfato. Siempre que se realizaron las determinaciones de concentración de cobre en cualquiera de los diferentes intervalos del estudio se realizó una curva de calibración previa antes de medir las muestras problema. Las diluciones preparadas a tal objeto han sido de 0,2; 0,7, 1, 2, 3, 4, 5, y 6 mg de cobre por litro de agua.

Las diluciones fueron preparadas a partir de soluciones patrón que contienen 1 g/litro Nitrato de cobre tres-hidrato en amoníaco 0,5 N de Panreac®. Se partió de una solución patrón de Nitrato de cobre.

Se realizaron tres medidas de absorbancia por cada dilución. La longitud de onda a la que se midió fue de 324,8 nm.

En la tabla 45 se muestran los valores obtenidos de absorbancia de cada muestra y sus valores de factores respuesta.

Concentración	nº prueba	resultado. Absorbancia	factor resp.
0,2 mg/litro	1	0,0307	0,1535
	2	0,0303	0,1515
	3	0,0301	0,1505
0,7 mg/litro	1	0,0901	0,1287
	2	0,0907	0,1296
	3	0,0909	0,1299
1 mg/litro	1	0,1324	0,1324
	2	0,1307	0,1307
	3	0,1234	0,1234
2 mg/litro	1	0,2603	0,1302
	2	0,2426	0,1213
	3	0,2459	0,1230
3 mg/litro	1	0,3286	0,1095
	2	0,3435	0,1145
	3	0,3789	0,1263
4 mg/litro	1	0,4817	0,1204
	2	0,5018	0,1255
	3	0,5037	0,1279
5 mg/litro	1	0,6011	0,1202
	2	0,6122	0,1224
	3	0,6106	0,1221
6 mg/litro	1	0,6997	0,1166
	2	0,7068	0,1178
	3	0,7017	0,1170

Tabla 45: resultados obtenidos en el ensayo de linealidad entre valores de absorbancia frente a concentración de ion Cu

Aunque con la técnica de Absorción Atómica, siempre se realiza previamente una recta de regresión con diferentes diluciones de muestras patrón, sí se ha considerado importante hacer una validación de la técnica y

calcular los parámetros correspondientes y exigidos como se ha llevado a cabo en los otros dos estudios.

A continuación se muestran los resultados del ajuste del modelo lineal para describir la relación existente entre la absorbancia y la concentración de cobre.

En la tabla 46 se resumen los valores de los límites de predicción y confianza que están representados en la gráfica 5.

	absorbancia	95%		95%	
Concentración	Predicho	Límites de predicción		Límites de confianza	
X	Y	Inferior (U.A.)	Superior(U.A.)	Inferior(U.A.)	Superior(U.A.)
0,2	0,0334	0,0038	0,0629	0,0240	0,0426
6,0	0,7159	0,6858	0,7461	0,7049	0,7269

Tabla 46. Límites de predicción y confianza para el valor mínimo y máximo de la recta de calibrado.

Los resultados del Análisis de la varianza (ANOVA) realizado sobre la pendiente y la ordenada de la recta de calibrado, se muestran en la tabla 47.

Análisis de Regresión - Modelo Lineal $Y = a + b \cdot X$

Variable dependiente: absorbancia

Variable independiente: concentración

Parámetro	Estimación	Error estándar	Estadístico T	p- valor
Ordenada	0,00984	0,0046	2,0943	0,0480
Pendiente	0,11769	0,0013	84,7253	0,0000

Tabla 47: Parámetros de regresión lineal de la absorbancia frente a la concentración.

Dado que el p-valor en la tabla ANOVA es inferior a 0,01, existe una relación estadísticamente significativa entre absorbancia y concentración para un nivel de confianza del 99%.

El estadístico R^2 indica que el modelo explica un 99,69% de la variabilidad en absorbancias. El coeficiente de correlación es igual a 0,998, indicando una relación relativamente fuerte entre las variables. El error

estándar de la estimación muestra la desviación típica de los residuos que es 0,01352. Este valor se usa para construir los límites de la predicción para las nuevas observaciones.

Análisis de la varianza

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente – F	p- Valor
Modelo	1,3122	1	1,3122	7178,38	0,0000
Residuo	0,0040	22	0,000182		
Falta de ajuste	0,0020	6	0,000344	2,82	0,0455
Error puro	0,0019	16	0,000122		
Total (Corr.)	1,3162	23			

Tabla 48: ANOVA

Coefficiente de Correlación = 0,9985

R-cuadrado = 99,6945 porcentaje

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 99,6806 porcentaje

Error estándar de est. = 0,0135

Error absoluto medio = 0,0095

Estadístico de Durbin-Watson = 1,3800 (P=0,0346)

Autocorrelación residual en Lag 1 = 0,2837

Se realizó el test de falta de ajuste para determinar si el modelo seleccionado es adecuado para describir los datos observados o si se debería utilizar un modelo más complicado. El test se realiza comparando la variabilidad de los residuos del modelo actual con la variabilidad entre las observaciones a valores duplicados de la variable independiente X. Dado que el p-valor para la Falta de Ajuste en la tabla 48 (ANOVA) es inferior a 0,05, existe una falta de ajuste estadísticamente significativa para un nivel de confianza del 95 %.

En la tabla 49 se muestra que de los modelos ajustados el modelo multiplicativo proporciona el valor de R^2 más alto con 99,84%. No obstante el modelo lineal también muestra un valor del factor de determinación muy alto que satisface nuestras exigencias como modelo matemático para establecer la relación entre absorbancia y concentración. Como ya hemos explicado con la técnica de Absorción Atómica, cada vez que se realizaba una determinación de la concentración de cobre en cualquiera de los diferentes experimentos realizados durante el estudio se calculaba previamente la recta de regresión lineal con unos patrones previamente elaborados. En todos los casos se

calculó el factor de determinación.

Comparación de Modelos Alternativos

Modelo	Correlación	R-cuadrado
Multiplicativo	0,9992	99,84%
Doble inverso	0,9987	99,75%
Lineal	0,9985	99,69%
Raíz cuadrada-X	0,9835	96,73%
Raíz cuadrada-Y	0,9822	96,47%
Log Probit	0,9753	95,12%
Logístico	0,9671	93,53%
Exponencial	0,9224	85,08%
Logarítmico-X	0,9175	84,18%
curva-S	-0,8917	79,51%
Inverso-X	-0,6754	45,62%
Inverso-Y	sin ajuste	

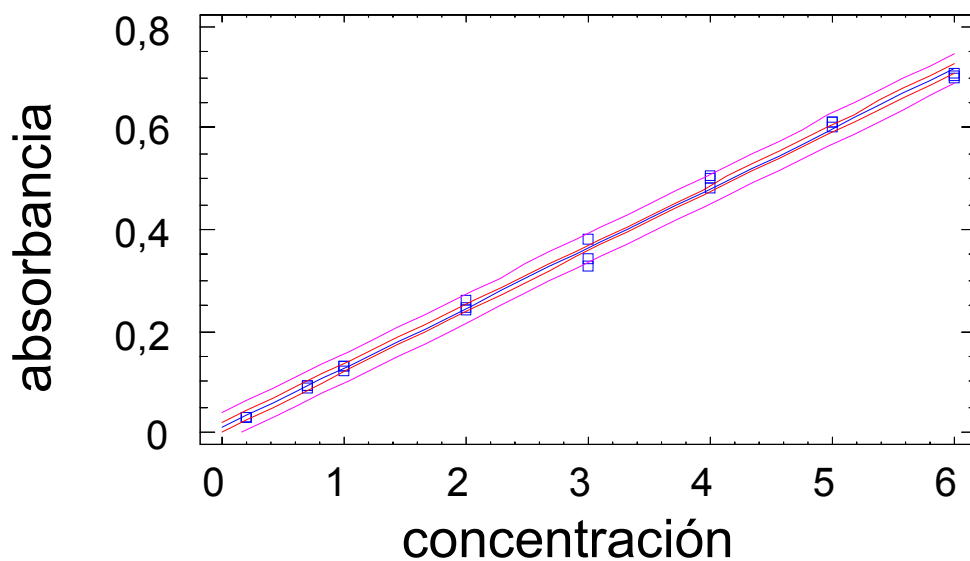
Tabla 49: Esta tabla muestra los resultados de ajuste a los datos de varios modelos curvilíneos.

La ecuación del modelo ajustado es:

$$\text{Absorbancia (U.A.)} = 0,00984013 + 0,11769 \cdot \text{concentración}$$

En la gráfica 12 se muestra la representación del mejor ajuste lineal entre las absorbancias y las concentraciones (línea azul). Los límites de predicción (líneas rojas internas) corresponden a las hipérbolas de la gráfica más cercanas a los puntos obtenidos experimentalmente, para un nivel del 95%; y los intervalos de confianza (líneas rosas externas), para un nivel de confianza del 95%, corresponden a las hipérbolas más separadas de los puntos experimentales.

Como se puede observar en la gráfica, todos los puntos de los resultados obtenidos se encuentran dentro de los límites de confianza y predicción.



Gráfica 12: Regresión lineal de los datos de absorbancia frente a concentraciones obtenidas (mg/l) en el ensayo de linealidad con los límites de confianza del 95%.

4.4.2. SENSIBILIDAD

Se determinaron una vez al principio del estudio, los límites de detección y cuantificación.

Para el cálculo de los límites de detección y cuantificación se tomaron los valores de 10 muestras de una misma concentración. Se eligió la concentración de 2,545 mg/l, y se midieron por absorción atómica

En la tabla 50 se muestran los resultados de la absorbancia de las 10 muestras.

Concentración:
2,545 mg/l

Muestras	Absorbancia
1	0,2972
2	0,2934
3	0,2935
4	0,2904
5	0,2950
6	0,2931
7	0,2938
8	0,2928
9	0,2966
10	0,2911
Media	0,2937
D.S.	0,0021
C.V. (%)	0,73 %

Tabla 50: valores de absorbancia

La fórmula que se emplea para hallar los valores de ambos límites es:

$$CI = (K * S_{bl}) / b$$

Donde

K: Constante que toma valores de tres para el límite de detección y de diez para el límite de cuantificación.

S_{bl}: Desviación estándar de las muestras: 0,0021

b: Pendiente de la recta de calibrado : 0,11

Los límites calculados son respectivamente

L. Detección: 0,5727 mg/l

L. Cuantificación: 1,909 mg/l

4.4.3. PRECISIÓN

De igual manera se determinaron la repetibilidad y la precisión intermedia al principio del estudio.

Repetibilidad.

Se realizó un mínimo de tres muestras a tres niveles de concentración para cubrir el intervalo especificado. A continuación se leyeron las absorbancias por Absorción Atómica.

nº de muestra	C = 2 mg/litro	C = 3 mg/litro	C = 4 mg/litro
1	0,2436	0,3759	0,4928
2	0,2456	0,3829	0,5066
3	0,2484	0,3777	0,5116
Media	0,2459	0,3789	0,5037
D.S.	0,0024	0,0036	0,0098
C.V. (%)	0,9866%	0,9603%	1,9411%

Tabla 51. Resultados del estudio de repetibilidad.

El coeficiente de variación nos indica que el método es repetible en el mismo día.

Precisión intermedia.

Se realizaron tres soluciones madre y de cada una de ellas se prepararon cuatro diluciones para tener las concentraciones siguientes: 3 mg/l, 4 mg/l, 5 mg/l, que fueron analizadas por absorción atómica

Este proceso se repitió en tres días distintos.

	C = 3 mg/litro	C = 4 mg/litro	C = 5 mg/litro
día 1	0,3444	0,5025	0,6052
	0,3455	0,4978	0,6189
	0,3407	0,5050	0,6126
día 2	0,3759	0,4928	0,6042
	0,3829	0,5066	0,6151
	0,3777	0,5116	0,6125
día 3	0,3495	0,4823	0,5817
	0,3562	0,4744	0,5910
	0,3561	0,4759	0,5877
Media	0,3588	0,4943	0,6032
D.S.	0,0160	0,0138	0,0133
C.V. (%)	4,46%	2,80%	2,21%

Tabla 52. Resultados de la precisión entre los tres días.

Los coeficientes de variación que aparecen en la tabla 52 son menores de 5%, lo que nos confirma que además el método tiene una buena precisión intermedia.

4.4.4. ROBUSTEZ

Se realizó un análisis de la muestra recién preparada y después de 24 horas.

Aunque como hemos mencionado anteriormente, la técnica lleva implícito el desarrollo de una curva de calibración previa al análisis de la muestra, si se ha considerado muy importante el realizar de igual manera la validación del método, por lo que se han calculado los parámetros de sensibilidad, precisión y robustez como en los demás productos estudiados.

Para el cálculo de la robustez se tomaron los valores de 3 muestras de una misma concentración a tiempo 0 y 24 horas después de la elaboración de la muestra. Se eligió la concentración de 2 mg/l, y se midieron por absorción atómica.

conc. 2 mg/litro muestras	Tiempo	
	t = 0	t = 24 h
1	0,2397	0,2436
2	0,2430	0,2456
3	0,2451	0,2484
% sulfato de cobre inalterado	100%	101,34%

Tabla 53: valores de robustez

De estos datos se puede concluir que las muestras pueden ser analizadas durante las 24 horas siguientes a su preparación, así como que la técnica de absorción atómica empleada en este estudio es válida para determinar la concentración de cobre en las muestras analizadas.

Por lo tanto una vez realizada la validación del método podemos concluir que el método de análisis es lineal en el intervalo de concentraciones utilizado, fiable, practicable e idóneo. Por lo que nos servirá como método de análisis de las muestras objeto de estudio. Aunque para mayor seguridad se ha realizado antes de cada determinación una curva de calibración.

4.5. ESTUDIO DE ESTABILIDAD DEL SULFATO DE COBRE EN SOLUCIÓN

Para realizar el estudio de estabilidad del sulfato de cobre al 0,1% en solución se considerarán los siguientes factores: la riqueza en principio activo, la temperatura y la contaminación microbiológica. Al igual que en el estudio anterior las condiciones de trabajo para realizar la solución de sulfato de cobre son similares, es decir en la oficina de farmacia y con materiales que no han sido previamente esterilizados, aunque también es conocida la capacidad antiséptica del sulfato de cobre (51, 53), si es absolutamente necesario para el propósito de nuestro estudio el control microbiológico.

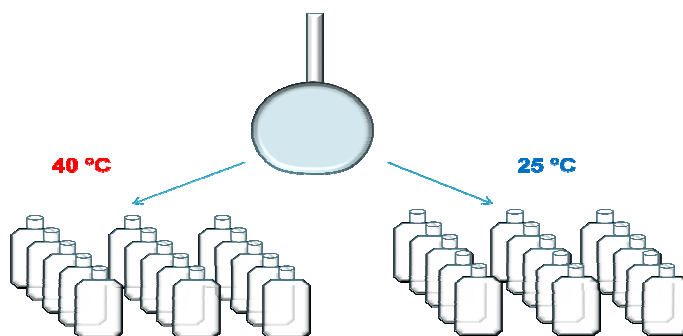
Por otro lado en el Formulario Nacional se establece para el preparado oficial de sulfato de cobre al 0,1% un período de validez de tres semanas (13), aunque como en el caso anterior de minoxidil no aporta ninguna metodología ni estudio o referencia bibliográfica donde se haya realizado algún estudio de estabilidad.

El diseño del estudio de estabilidad está basado también en las normas ICH por lo que las pruebas se harán a los tiempos 0, 3 y 6 meses como mínimo, a largo plazo ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) y en condiciones aceleradas $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ de temperatura.

En este caso por tratarse también de un principio activo disuelto en agua y envasado en envase de plástico cerrado, se realiza el estudio en condiciones de humedad ambiental y controlando la temperatura de almacenamiento.

Se elaboran 2 litros de solución de sulfato de cobre al 0,1 % y se distribuyen en partes alícuotas en envases de plástico valona de 50 ml de capacidad.

El esquema final es el siguiente:



La cantidad final utilizada para almacenamiento fue de 1500 ml, dado que se almacenaron 15 envases de 50 ml a una temperatura de 40 °C y 15 envases de 50 ml a una temperatura de 25 °C.

Con la cantidad sobrante se realizó un análisis por absorción atómica para determinar la riqueza a tiempo cero de la solución madre preparada. Se prepararon 3 muestras de 50 ml cada una.

Se realiza también una gravimetría de todos y cada uno de los envases almacenados en las estufas que se repite cada vez que se vaya a realizar el ensayo de potencia correspondiente.

Las determinaciones de potencia se realizan a tiempo:

0,1,3 y 6 meses como mínimo.

Los envases preparados a partir del lote original de sulfato de cobre 0,1% en solución acuosa, se pesaron previamente con el propósito de controlar posteriormente cualquier desviación significativa en peso que pudiera hacer sospechar una evaporación del disolvente con el consiguiente aumento de la concentración de la solución original.

Los datos obtenidos fueron los siguientes:

4.6. RESULTADOS. GRAVIMETRÍAS Y VALORES INICIALES.

En azul figuran los viales utilizados para determinar la potencia por medio de la técnica de Absorción Atómica (AA).

Tª 25 °	g	g	G	g
Muestras	tiempo 0	tiempo 1 mes	tiempo 3 meses	tiempo 6 meses
1	68,402	68,332		
2	68,554	68,532		
3	67,784	67,762		
4	68,580		68,460	
5	68,190		68,032	
6	67,598		67,554	
7	71,218			71,130
8	67,546			67,444
9	68,156			67,886

Tabla 54: Gravimetrías de envases de plástico almacenados a 25 °C

Tª 40 °	g	g	G	g
muestras	tiempo 0	tiempo 1 mes	tiempo 3 meses	tiempo 6 meses
1	67,398	67,312		
2	69,686	69,581		
3	66,906	66,483		
4	66,896		66,510	
5	67,682		67,432	
6	67,422		66,944	
7	66,936			66,088
8	70,110			69,553
9	67,974			67,044

Tabla 55: Gravimetrías de envases de plástico almacenados a 40 °C

Después se realizó una determinación por absorción atómica, para comprobar la concentración de sulfato de cobre a tiempo 0.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Muestras	concentración observada mg/l	% recuperación
1	2,596	102,04%
1	2,601	102,24%
1	2,653	104,28%
2	2,570	101,02%
2	2,588	101,73%
2	2,590	101,81%
3	2,517	98,94%
3	2,526	99,29%
3	2,536	99,69%
promedio	2,575	101,23%
d. est	0,04	
Cv	1,68%	

Tabla 56: valores de concentración a tiempo 0, valor de $R^2 = 0,9994$

Se observan en las graviemtrías ciertas perdidas de peso. La razón es la evaporación del disolvente, pues el envase utilizado no llega a ser tan hermético como los viales que se utilizaron en el estudio de minoxidil.

4.7. ESTABILIDAD A LARGO PLAZO

Se determinó la concentración de las muestras en los meses 1, 3 y 6 después de haber sido almacenadas en una estufa a 25° C y se compararon con una solución patrón de sulfato de cobre recién elaborada. Ver tablas 57, 58 y 59. Las muestras fueron envasadas en envase de plástico valona.

4.8. RESULTADOS A LARGO PLAZO

A continuación se muestran los valores de concentración de sulfato de cobre.

Valores a 1 mes

T ^a	nº de muestra	Concentración mg/l	% recuperación
25°C	1	2,456	
	2	2,413	
	3	2,474	
	Promedio	2,448	96,21%
	des. Est	0,031	
	c.v.	1,28%	
Control	1	2,531	
	2	2,553	
	3	2,554	
	Promedio	2,554	100,37%
	des. Est	0,001	
	c.v.	0,03%	

Tabla 57: valores de concentración después de 1 mes. $R^2 = 0,998$

Valores a 3 meses

T ^a	nº de muestra	Concentración mg/l	% recuperación
25°C	4	2,581	
	5	2,536	
	6	2,509	
	Promedio	2,542	99,92%
	des. Est	0,036	
	c.v.	1,43%	
Control	1	2,663	
	2	2,681	
	3	2,699	
	Promedio	2,681	105,39%
	des. Est	0,013	
	c.v.	0,47%	

Tabla 58: valores de concentración después de 3 meses. $R^2 = 0,997$ **Valores a 6 meses**

T ^a	nº de muestra	Concentración mg/l	% recuperación
25°C	7	2,555	
	8	2,555	
	9	2,479	
	Promedio	2,530	99,44%
	des. Est	0,044	
	c.v.	1,73%	
Control	1	2,671	
	2	2,650	
	3	2,658	
	Promedio	2,660	104,55%
	des. Est	0,006	
	c.v.	0,21%	

Tabla 59: valores de concentración después de 6 meses. $R^2 = 0,997$

En el estudio a largo plazo se ha evaluado la concentración de sulfato de cobre de las muestras almacenadas a 25 °C en los intervalos de tiempo siguientes: 1, 3 y 6 meses.

En todos los intervalos de tiempo medidos se realizó una recta de regresión para comprobar la linealidad del método y se comparó también con una muestra de sulfato de cobre recién preparada. Las concentraciones obtenidas están todas comprendidas entre el 95 y el 105% con unos coeficientes de variación también inferiores al 5%. Sólo hemos encontrado un valor por encima del 105 % y corresponde con el valor de la muestra control en la prueba realizada a los tres meses. Puede ser por un ligero exceso en la concentración de sulfato de cobre preparada en el momento antes de la medición. De cualquier manera nunca se llegó a valores por encima del 106%.

4.9. ESTABILIDAD EN CONDICIONES ACELERADAS

Se determinó la concentración de las muestras en los meses 1, 3 y 6 después de haber sido almacenadas en una estufa a 40° C y se compararon con una solución patrón de sulfato de cobre recién elaborada. Ver tablas 60, 61 y 62. Las muestras fueron envasadas en envase de plástico valona.

4.10. RESULTADOS EN CONDICIONES ACELERADAS

A continuación se muestran los valores de concentración de sulfato de cobre.

T ^a	nº de muestra	Concentración mg/l	% recuperación
40°C	1	2,540	
	2	2,591	
	3	2,533	
Promedio		2,555	100,42%
des. Est		0,032	
c.v.		1,24%	
Control	1	2,531	
	2	2,553	
	3	2,554	
Promedio		2,554	100,37%
des. Est		0,001	
c.v.		0,03%	

Tabla 60: valores de concentración después de 1 mes. $R^2 = 0,998$

T ^a	nº de muestra	Concentración mg/l	% recuperación
40°C	4	2,580	
	5	2,603	
	6	2,603	
Promedio		2,595	102,02%
des. Est		0,013	
c.v.		0,51%	
Control	1	2,663	
	2	2,681	
	3	2,699	
Promedio		2,681	105,39%
des. Est		0,013	
c.v.		0,47%	

Tabla 61: valores de concentración después de 3 meses. $R^2 = 0,997$

Tª	nº de muestra	Concentración mg/l	% recuperación
40°C	7	2,546	
	8	2,664	
	9	2,558	
Promedio		2,589	101,78%
des. Est		0,065	
c.v.		2,51%	
Control	1	2,671	
	2	2,650	
	3	2,658	
Promedio		2,660	104,55%
des. Est		0,006	
c.v.		0,21%	

Tabla 62: valores de concentración después de 6 meses. $R^2 = 0,997$

En el estudio en condiciones aceleradas se ha evaluado la concentración de sulfato de cobre de las muestras almacenadas a 40 °C en los intervalos de tiempo siguientes: 1, 3 y 6 meses.

En todos los intervalos de tiempo medidos se realizó una recta de regresión para comprobar la linealidad del método y se comparó también con una muestra de sulfato de cobre recién preparada. Las concentraciones obtenidas están todas comprendidas entre el 95 y el 105% con unos coeficientes de variación también inferiores al 5%. El valor por encima del 105% ya ha sido explicado en la discusión anterior. Si bien podemos observar un ligero aumento en la concentración de sulfato de cobre en las muestras a 40° C que en la observada para las muestras almacenadas a 25 °C. Esto puede ser debido a que la evaporación en las muestras de 40 °C es mayor que en las de 25 °C. Por lo tanto a la vista de los resultados obtenidos, se puede concluir a priori que el sulfato de cobre permanece estable cuando se almacena a diferentes temperaturas. No obstante se realizará un análisis estadístico que complete el estudio y extraiga posibles diferencias.

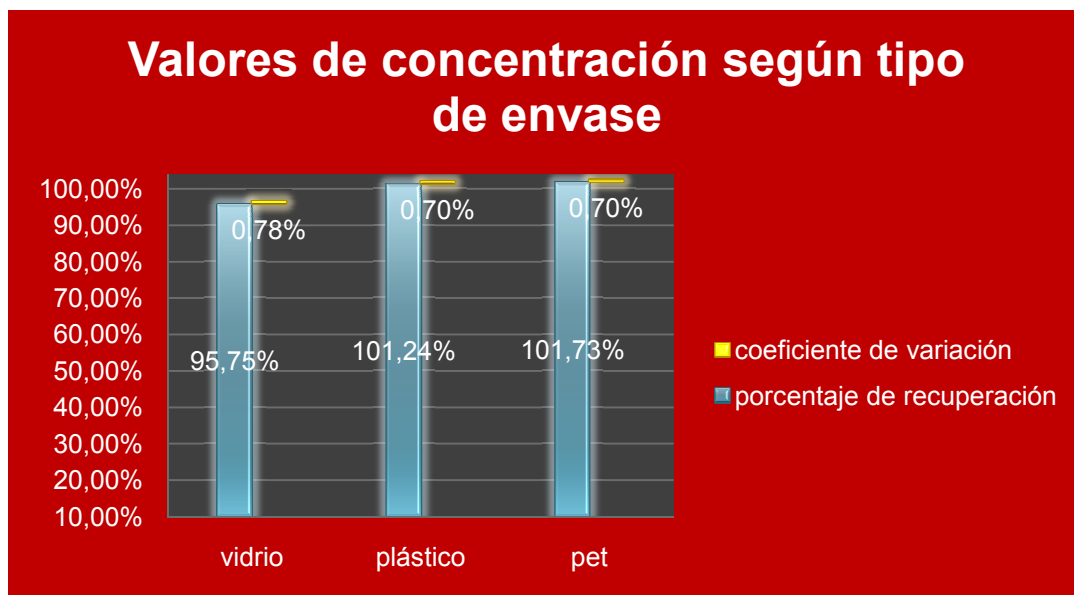
4.11. INFLUENCIA DEL TIPO DE ENVASE

Se elaboró un lote de 2 litros de solución de sulfato de cobre al 0,1% y se repartió de la siguiente manera: tres envases de 250 ml de solución de

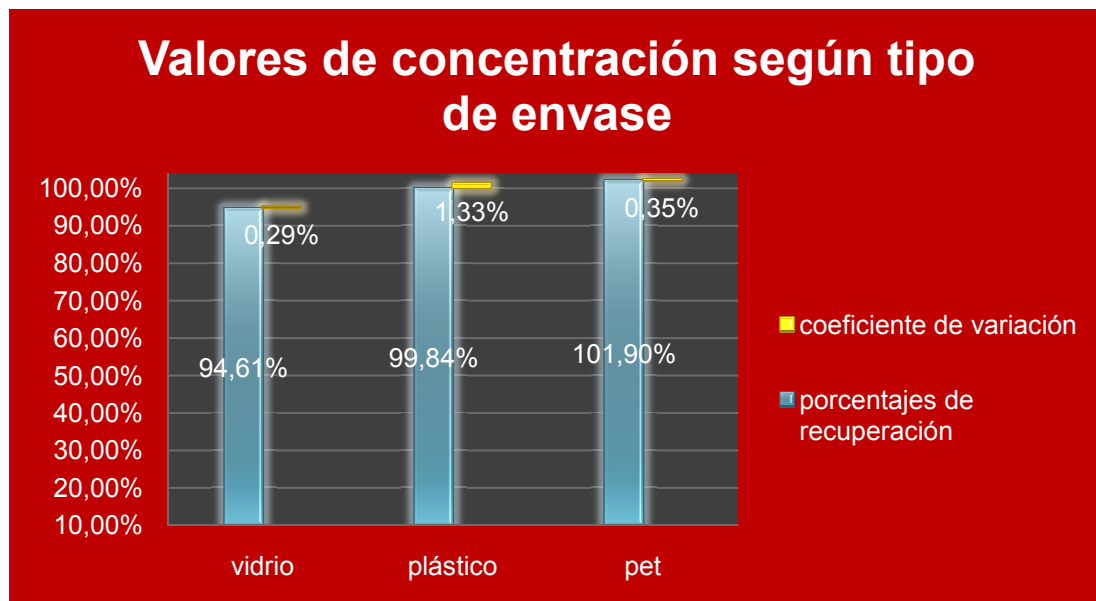
sulfato de cobre envasadas en vidrio, tres envasadas en plástico valona y tres envasadas en PET. Al día siguiente se realizó una determinación de la concentración por absorción atómica. Esta prueba se repitió una segunda vez al cabo de tres meses.

4.12. RESULTADOS INFLUENCIA DEL TIPO DE ENVASE

A continuación se muestran los valores de concentración de sulfato de cobre según el tipo de envase utilizado.



Gráfica 13: valores prueba 1.



Gráfica 14: valores prueba 2.

En el estudio de la influencia del tipo de envase se ha evaluado la concentración de sulfato de cobre para ver si existe algún tipo de diferencia en función del material del envase utilizado debido a posibles fenómenos de absorción y adsorción como ya se ha mencionado que determinados materiales como el vidrio pueden realizar. Los envases habituales en la oficina de farmacia son los de plástico y vidrio. También se están imponiendo últimamente los envases de PET, por ser este un material semejante al vidrio en apariencia pero sin dejar de ser un polímero con las ventajas típicas del plástico en cuanto a su menor peso y menor fragilidad.

Las concentraciones obtenidas tanto en la prueba 1 como en la 2, es en los envases de vidrio donde encontramos valores inferiores, incluso por debajo del 95% como es el caso de la prueba 2. No obstante realizaremos un análisis estadístico para ver si hay diferencias significativas.

4.13. ESTUDIO MICROBIOLÓGICO

Al igual que en el estudio anterior de minoxidil y por las mismas razones, se considera necesario realizar un estudio microbiológico y determinar el recuento de microorganismos aerobios viables totales en las muestras, siguiendo el método de la RFE (49) y realizar un recuento de bacterias aerobias viables y de hongos (50).

Se utiliza también el método de filtración. En nuestro caso partimos de una solución de sulfato de cobre al 0,1%.

Técnica:

Se parte de 3 muestras de solución sulfato de cobre al 0,1% de 250 ml cada una, envasadas en envase de plástico. Seguidamente se realizan dos tomas de muestra de cada envase, una de 1 ml que se diluye hasta 10 ml con el diluyente (solución de peptona y cloruro sódico) y otra de 10 ml de solución de sulfato de cobre para cada uno de los medios de cultivo que serán:

- Agar caseína-soja o Agar Triptófano-soja (para recuento de bacterias viables)
- Agar glucosa de Sabouraud (para recuento de mohos y levaduras)

Cada dilución se añade sobre el filtro colocado en el equipo de filtración.

El resto de la técnica es igual que la ya descrita en el estudio de minoxidil, incubándose a 30 – 35 °C durante 48 – 72 horas para las bacterias y a 20 – 25 °C durante 5 días para los hongos.

Después de incubar se cuenta el número de UFC (unidades formadoras de colonias)/ml obtenidas.

4.14. RESULTADOS ESTUDIO MICROBIOLÓGICO.

Las soluciones de sulfato de cobre al 0,1% preparadas según se describe en el Formulario Nacional (13), envasadas en frascos de plástico y conservadas a las temperaturas establecidas por la RFE, no presentaron ningún crecimiento bacteriano ni de hongos significativo en ninguno de los períodos evaluados, según se describe en las tablas 63 y 64.

Medio cultivo bacterias (*Agar – Triptófano Soja*)

Muestra	Tiempo 0	1 mes	3 meses	6 meses	12 meses
Nº1 (1/10 ml)	0 ufc	0 ufc			
Nº1 (10 ml)	1 ufc	0 ufc	0 ufc	0 ufc	2-3 ufc
Nº2 (1/10 ml)	1 ufc	1 ufc			
Nº2 (10 ml)	0 ufc	0 ufc	0 ufc	0 ufc	0 ufc
Nº3 (1/10 ml)	0 ufc	0 ufc			
Nº3 (10 ml)	0 ufc	0 ufc	0 ufc	2 ufc	0 ufc
Control					
Medio	0 ufc	0 ufc	0 ufc	0 ufc	0 ufc
Control					
Diluyente	0 ufc	0 ufc	1 ufc	0 ufc	0 ufc

Tabla 63: ufc/ml tras el período de incubación. Medio de cultivo para bacterias.

Se observa que a tiempo 0 hubo crecimiento en las muestras 1 de 10 ml y en la 2 de 1/10 ml de sólo 1 ufc en ambos casos. A tiempo 3 meses también creció una colonia en la muestra 3 de 10 ml y en el control diluyente. En los tiempos 6 y 12 meses no hubo crecimiento de ninguna colonia de bacterias.

A partir de los tres meses no se realizaron cultivos con muestras diluidas 1/10 ml dado el escaso crecimiento en las pruebas anteriores y para ahorrar costes.

Medio cultivo hongos (*Agar Sabouraud*)

Muestra	Tiempo 0	1 mes	3 meses	6 meses	12 meses
Nº1 (1/10 ml)	0 ufc				
Nº1 (10 ml)	0 ufc	0 ufc	0 ufc	0 ufc	2-3 ufc
Nº2 (1/10 ml)	3 ufc				
Nº2 (10 ml)	8 ufc	0 ufc	0 ufc	0 ufc	0 ufc
Nº3 (1/10 ml)	0 ufc				
Nº3 (10 ml)	0 ufc	0 ufc	0 ufc	1 ufc	0 ufc
Control					
Medio	0 ufc	0 ufc	0 ufc	0 ufc	0 ufc
Control					
Diluyente	0 ufc	0 ufc	0 ufc	0 ufc	1 ufc

Tabla 64: ufc/ml tras el período de incubación. Medio de cultivo para hongos.

En el caso de los hongos, se observó un crecimiento de 3 ufc en la muestra 2 (dilución 1/10 ml) y de 8 ufc en la muestra 2 sin diluir de 10 ml. También se procedió de igual manera con las diluciones, es decir sólo se cultivaron a partir de tiempo 3 meses las muestras de 10 ml sin diluir, aún así como se puede observar no hubo crecimiento significativo de ninguna colonia,

sólo en las muestras nº 3 (tres meses, 10 ml) y en el control diluyente al cabo de 12 meses se observó 1 ufc en cada una de ellas.

Cultivo de bacterias a tiempo = 0



Foto 4: Muestra 1 de 10 ml en Agar Triptófano Soja a tiempo = 0. Se observa una ufc.

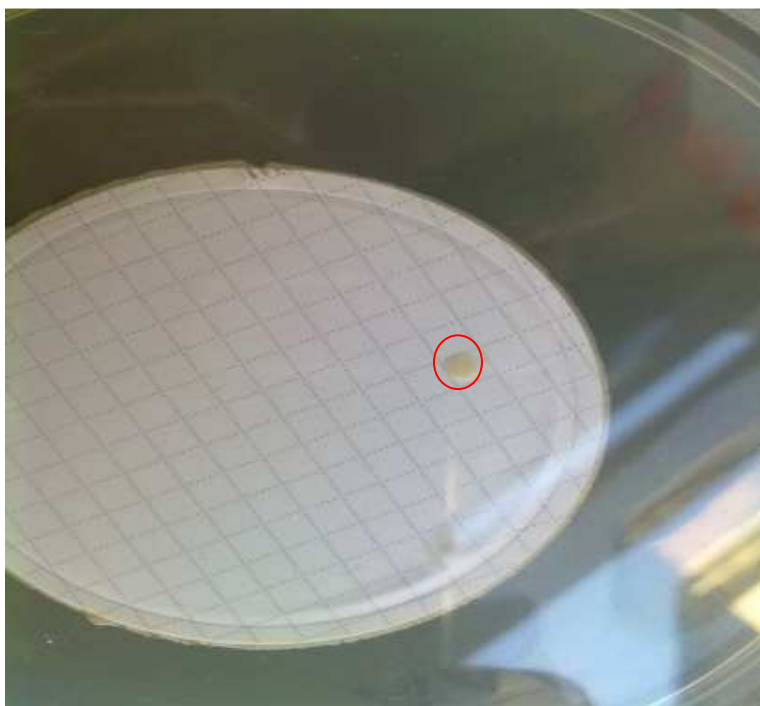


Foto 5: Muestra 2 de 1/10 ml en Agar Triptófano Soja a tiempo = 0. Se observa una ufc de bacterias.

Cultivo de hongos a tiempo = 0



Foto 6: Muestra 2 de 1 ml en Agar Sabouraud a tiempo = 0. Se observan tres UFC de hongos.

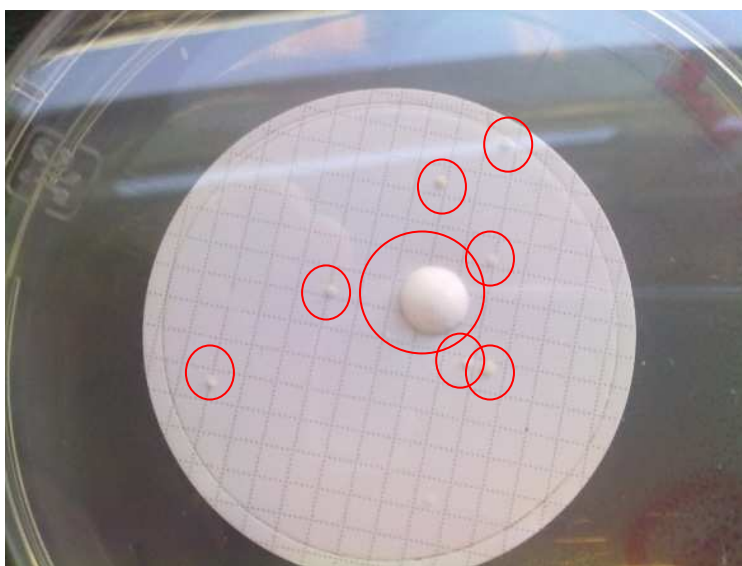


Foto 7: Muestra 2 de 10 ml en Agar Sabouraud a tiempo = 0. Se observan ocho UFC de hongos.

Cultivos de bacterias al mes



Foto 8: Muestra 2 de 1/10 ml en Agar Triptófano Soja a tiempo = 1mes. Se observa una ufc.

Cultivos a los 3 meses

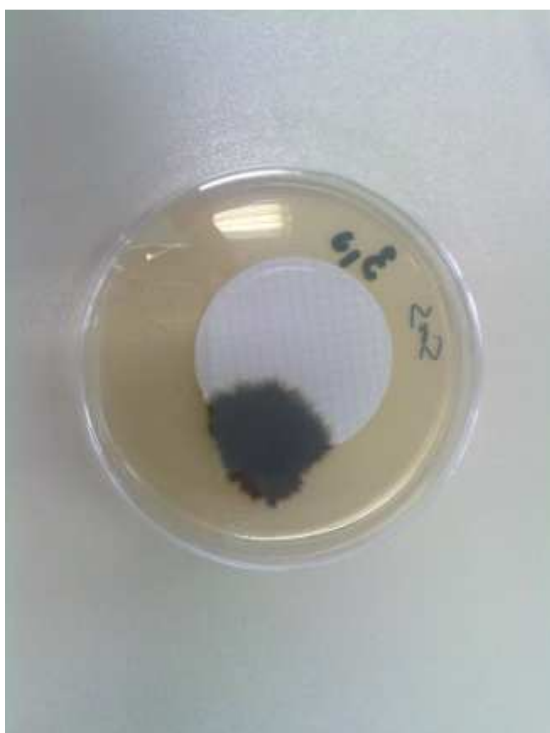
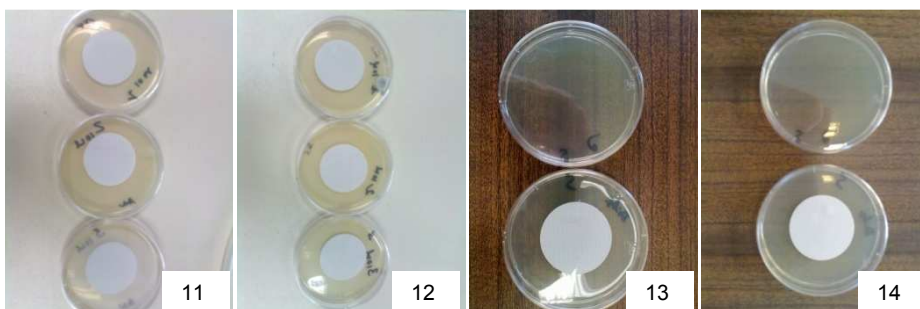


Foto 9: Muestra 3 de 10 ml en Agar Sabouraud a tiempo = 3 meses. Contaminación por alternaria.



Foto 10: Controle diluyente en Agar Sabouraud a tiempo = 3 meses. Se observa una ufc.

Cultivos a los 6 meses



Fotos 11, 12, 13, 14: Controles y medios de cultivo en Agar Triptófano Soja y en Agar Sabouraud a los 6 meses. Sin crecimiento en ningún caso.

Cultivos a los 12 meses



Foto 15: control diluyente en Agar Sabouraud. Se observa una ufc, posiblemente contaminación por *Cladosporium*.

DISCUSIÓN

Potencia.

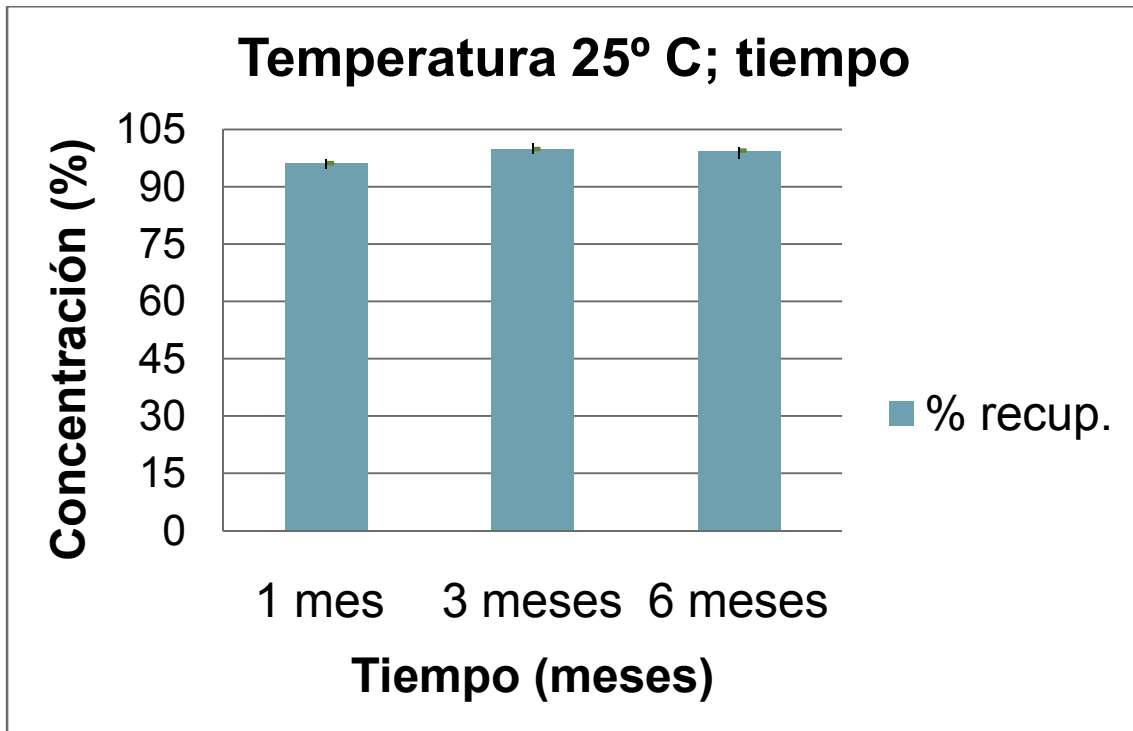
Al igual que en el análisis del minoxidil se ha seguido la normativa del ICH, CPMP/QWP/122/02, donde se marcan los valores límites generales del 95 al 105%, como valores límite aceptables de potencia.

Durante los 6 meses que ha durado el estudio no se han encontrado valores de potencia que estén fuera de estos límites de aceptación. En la tabla 102 se muestran los valores del porcentaje de recuperación obtenidos a tiempo 0, al mes, a los 3 meses y a los 6 meses después de la elaboración del lote del producto preparado, sulfato de cobre 0,1% en solución acuosa. Los valores del porcentaje de recuperación se obtienen de dividir la concentración obtenida en el momento de la prueba por el valor 2,544 que se corresponde con el 100% del valor teórico concentración de sulfato de cobre

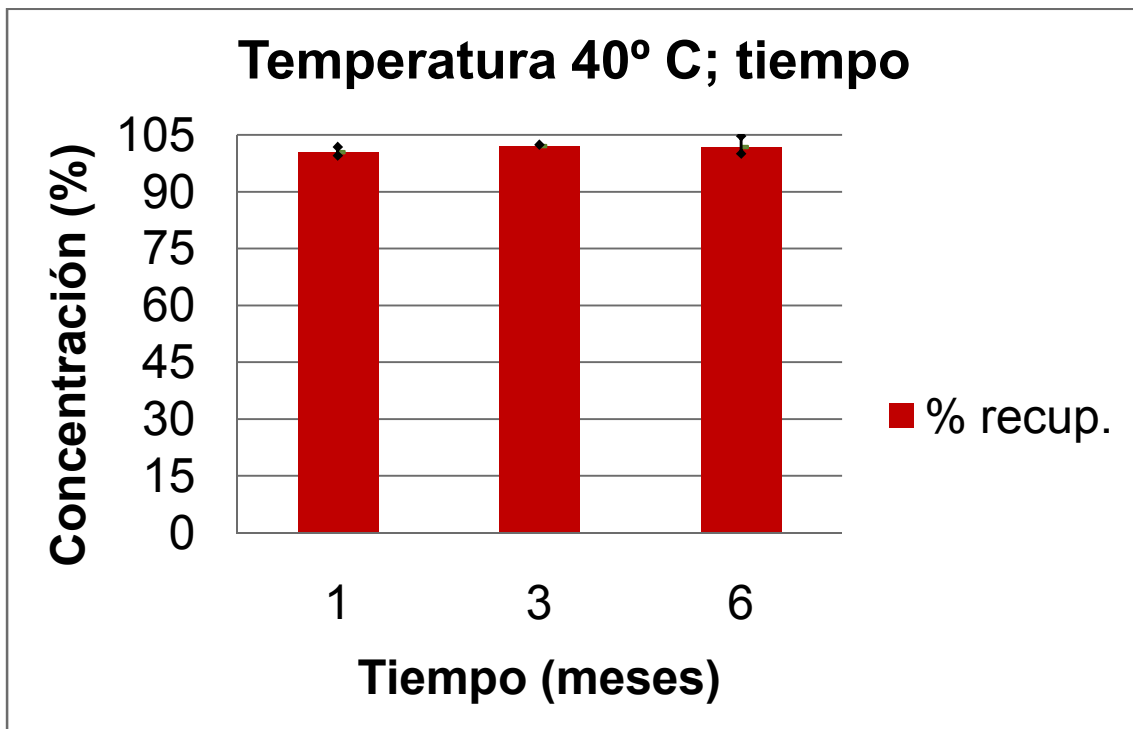
	tiempo 0	1 mes		3 meses		6 meses	
		25 °C	40 °C	25 °C	40 °C	25 °C	40 °C
% recuperación	101,23%	96,21%	100,42%	99,92%	102,02%	99,44%	101,78%
C.V.	1,68%	1,28%	1,24%	1,43%	0,51%	1,73%	2,51%

Tabla 65: porcentajes de concentración a lo largo del estudio y valores del coeficiente de variación (C.V.) en %

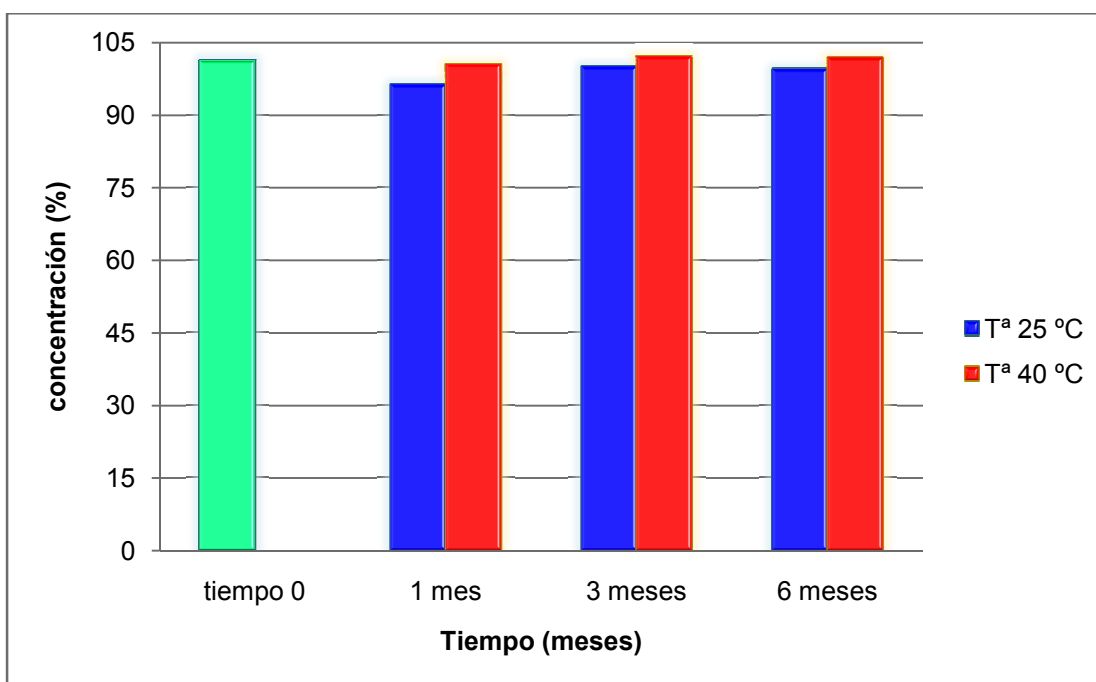
A continuación se muestran las gráficas de porcentajes de recuperación en concentración según temperatura de almacenamiento y evolución en el tiempo. Como podemos comprobar los datos de concentración están dentro de los límites de riqueza aceptables de $\pm 5\%$, según criterio general actual de la Unión Europea. Además el coeficiente de variación es también inferior al 5%, lo que nos ofrece mayor fiabilidad de los datos obtenidos. Esto es así tanto para los frascos almacenados a largo plazo a 25° C de temperatura como para los almacenados en condiciones aceleradas a 40° C.



Gráfica 15: Valores de concentración de las muestras almacenadas a 25° C durante los intervalos de tiempo marcados.



Gráfica 16: Valores de concentración de las muestras almacenadas a 40° C durante los intervalos de tiempo marcados.



Gráfica 17: Datos comparativos de los valores de concentración a 25 y 40° C

No obstante aunque los valores de riqueza no han superado el intervalo del $\pm 5\%$ es conveniente hacer un estudio estadístico comparativo para saber si se mantiene la hipótesis nula, es decir los valores a diferentes temperaturas no muestran diferencias estadísticamente significativas.

Para ello recurrimos a un estudio de comparación de varias muestras:

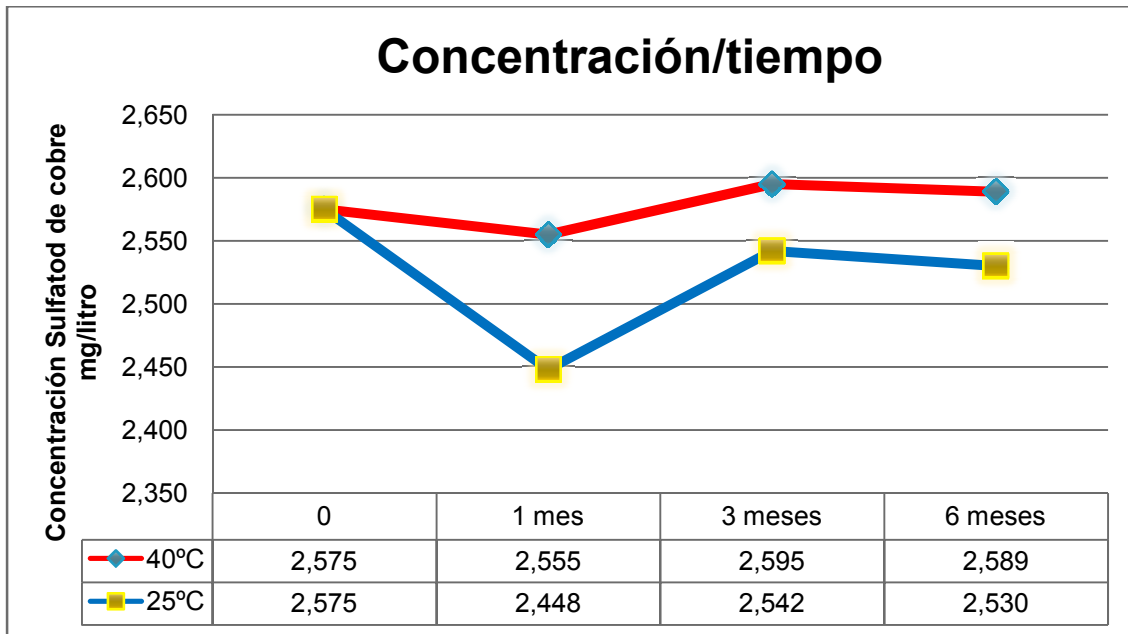
Resumen del Procedimiento.

Muestra 1: muestras de sulfato de cobre almacenadas a 25°C

Muestra 2: muestras de sulfato de cobre almacenadas a 40°C

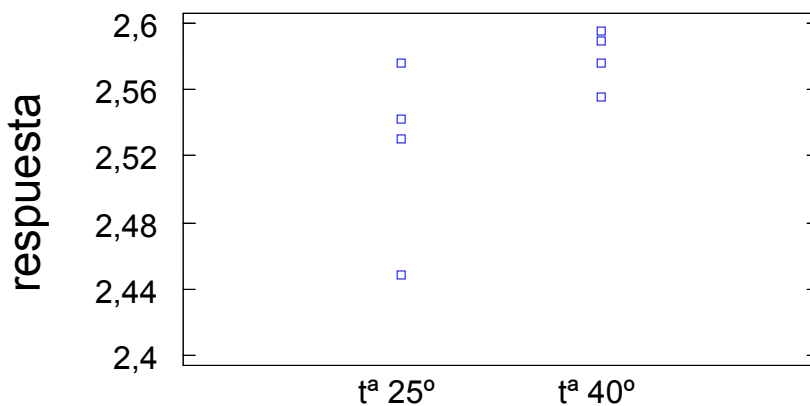
Muestra 1: tiene 4 valores comprendidos entre 2,448 hasta 2,575

Muestra 2: tiene 4 valores comprendidos entre 2,555 hasta 2,595



Gráfica 18: Valores de concentración a lo largo del tiempo de las muestras almacenadas a diferentes temperaturas.

Este procedimiento compara los datos en 2 columnas de los valores de concentración a temperatura de 25 °C con los valores de concentración a temperatura de 40 °C según se ha expuesto en el resumen del procedimiento y los datos que aparecen en la gráfica 19, realizando varios test estadísticos y gráficos para comparar las muestras. El F-test en la tabla de ANOVA comprobará si hay alguna diferencia significativa entre las medias.

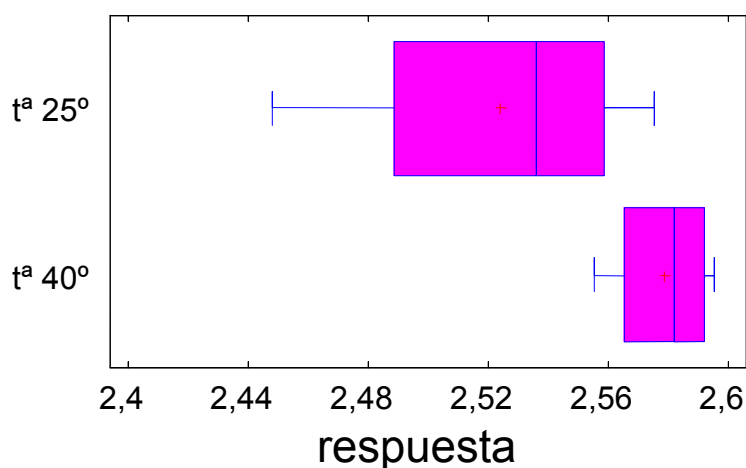


Gráfica 19: dispersión de las muestras 1 y 2.

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente-F	p-Valor
Entre grupos	0,005995	1	0,005995	3,71	0,1022
Intra grupos	0,009683	6	0,001613		
Total (Corr.)	0,015678	7			

Tabla 66: Análisis de la varianza

La tabla 66 descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro de cada grupo. El F-ratio, que en este caso es igual a 3,71455, es el cociente de la estimación entre grupos y la estimación dentro de los grupos. Puesto que el p-valor del test F es superior o igual a 0,05, no hay diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 2 variables a un 95%.

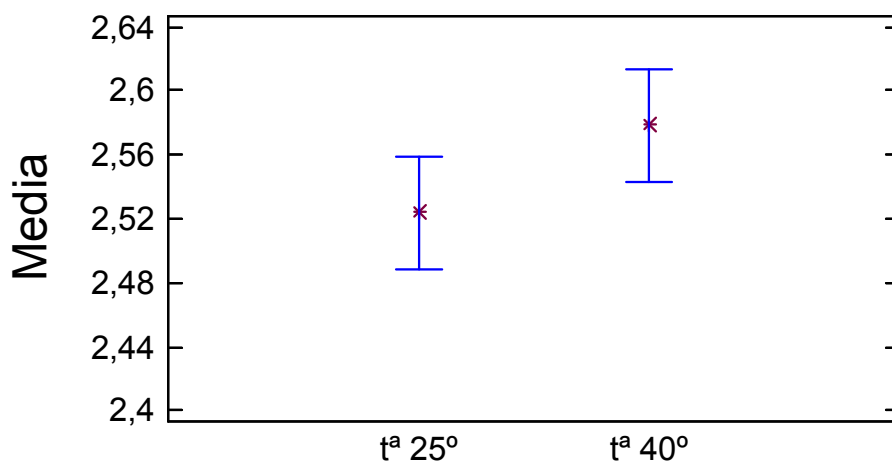
**Gráfica 20:** Gráfica de cajas y bigotes de los datos

	Frecuencia	Media	Error estándar	Límite inferior	Límite superior
Tª 40°C	4	2,5237	0,02008	2,4889	2,5585
Tª 25°C	4	2,5785	0,02008	2,5437	2,6132
Total	8	2,5511			

Tabla 67: medias con 95 intervalos LSD (menores diferencias significativas)

Esta tabla 67 muestra la media para cada columna de datos. También muestra el error estándar de cada media, que es la medida de su variabilidad en la muestra. El error estándar es el resultado de dividir la desviación típica agrupada por la raíz cuadrada del número de observaciones en cada nivel. La tabla también muestra un intervalo que incluye cada media. Los intervalos mostrados actualmente se basan en el procedimiento de las menores diferencias significativas de Fisher (LSD), (ver gráfica 21). Se construyen de tal manera que si dos medias son iguales, sus intervalos se solaparán el 95% de las veces.

Medias y 95,0 Porcentajes Intervalos LSD



Gráfica 21: menores diferencias significativas

Por último se realizó también el test de Kruskal-Wallis que prueba la hipótesis nula de igualdad de las medianas dentro de cada una de las 2 columnas. Los datos de todas las columnas primero se combinan y se ordenan de menor a mayor.

Entonces se calcula el rango medio para los datos en cada columna. Puesto que el p-valor es superior o igual a 0,05, no hay diferencia estadísticamente significativa entre las medianas a un nivel de confianza del 95%.

	Tamaño muestral	Rango medio
T ^a 25°C	4	2,875
T ^a 40°C	4	6,125

Estadístico = 3,5632 P-valor = 0,0590

Tabla 68: Test de Kruskal-Wallis

Por lo tanto no se observan diferencias estadísticamente significativas entre las muestras almacenadas a largo plazo ($25^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$) y las almacenadas en condiciones aceleradas ($40^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$) en cuanto a potencia. No obstante la pérdida de peso de los frascos almacenados a 40°C puede haber producido una concentración del producto por evaporación del disolvente.

Estudio comparativo entre diferente tipo de envases

Se ha realizado el análisis estadístico comparativo con los resultados de concentraciones obtenidos en los distintos tipos de envases, vidrio, plástico y polietilentereftalato (pet) para comprobar si influye realmente el tipo de material del que está elaborado el envase.

Hay antecedentes de trabajos realizados con el fin de determinar la influencia del envase en la estabilidad de los productos farmacéuticos como la metadona en solución (2). También se han encontrado otros trabajos donde se estudia como interfieren los diferentes tipos de envases en la concentración y estabilidad de los productos que contienen (61 y 62).

Se han realizado dos pruebas comparativas entre los distintos tipos de envase, una a tiempo 0 y otra a los tres meses de inicio del estudio. Dado que se encontraron ciertas diferencias en cuanto a concentración del ión Cu^{2+} en el primer ensayo (tiempo 0) se repitió a los tres meses coincidiendo con la determinación de la concentración de las muestras almacenadas a diferentes temperaturas. Las pruebas se realizaron siempre sobre muestras preparadas el día anterior a la determinación de la concentración por Absorción Atómica. Se usaron tres tipos diferentes de envase, de plástico valona, Pet y vidrio.

Datos y estudio estadístico del primer ensayo a tiempo cero:

Los valores de concentración obtenidos en este primer ensayo no superaron ninguno una diferencia superior a $\pm 5\%$ en cada uno de los diferentes tipos de envase como hemos visto en el apartado de resultados. No obstante, lo que nos ha interesado investigar es si hay o puede haber diferencias significativas de concentración en cuanto a la utilización de los diferentes tipos de envase, debido a los fenómenos de absorción y adsorción de los iones como el Cu^{2+} por la estructura de los materiales usados en la fabricación de los envases.

Por ello hemos realizado un estudio estadístico comparativo entre las riquezas obtenidas en cada envase y cuyos valores se muestran a continuación:

Resumen del procedimiento

Muestra 1: envase de pet

Muestra 2: envase de plástico

Muestra 3: envase de vidrio

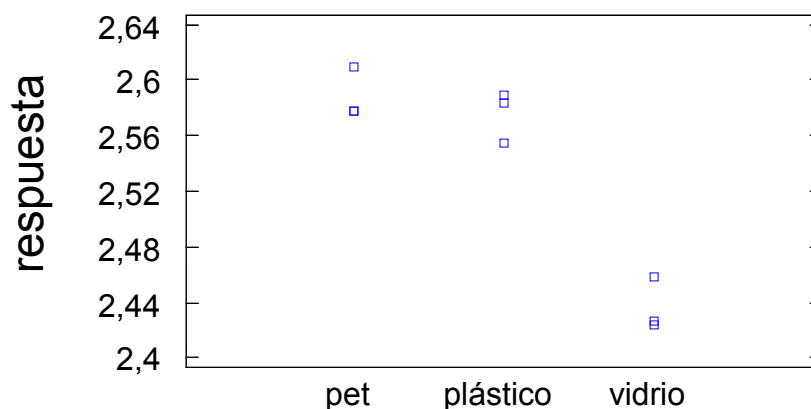
Muestra 1: 3 valores 2,577 hasta 2,609

Muestra 2: 3 valores 2,555 hasta 2,589

Muestra 3: 3 valores 2,424 hasta 2,458

Este procedimiento compara los datos en 3 columnas de los valores de concentración de cada tipo de envase. Realiza varios test estadísticos y

gráficos para comparar las muestras. El F-test en la tabla de ANOVA comprobará si hay alguna diferencia significativa entre las medias.



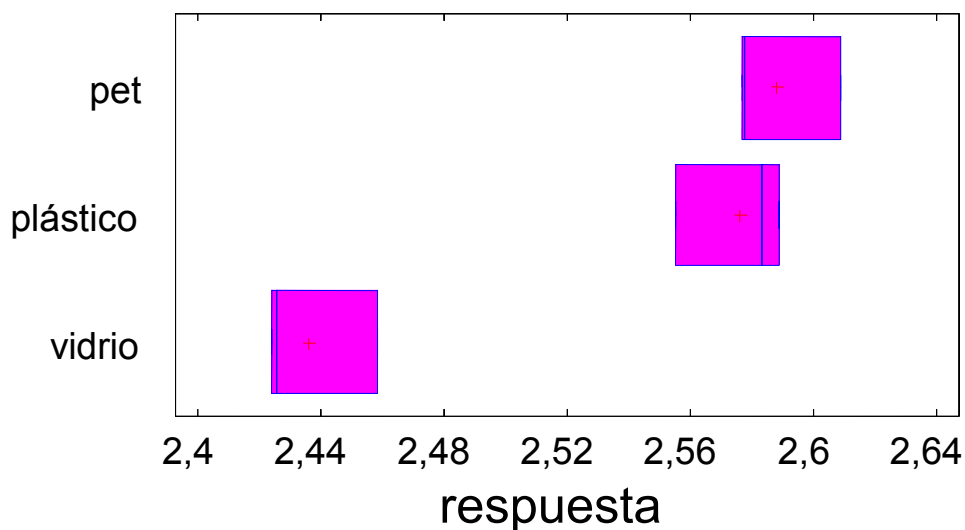
Gráfica 22: dispersión de las muestras 1, 2 y 3.

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente-F	p-Valor
Entre grupos	0,0427629	2	0,0213814	62,62	0,0001
Intra grupos	0,00204867	6	0,000341444		
Total (Corr.)	0,0448116	8			

Tabla 69: Análisis de la varianza

La tabla 69 descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro de cada grupo. El F-ratio, que en este caso es igual a 62,62, es el cociente de la estimación entre grupos y la estimación dentro de los grupos. Puesto que el p-valor del test F es inferior a 0,05, hay diferencia estadísticamente significativa entre las medias de

las 3 variables a un nivel de confianza del 95,0%.



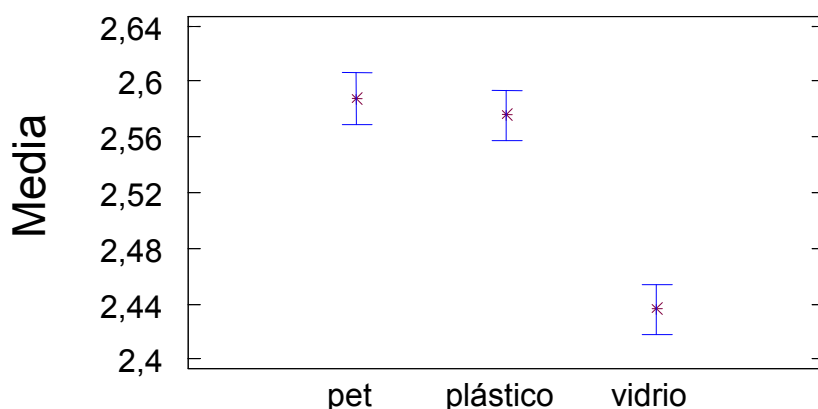
Gráfica 23: Gráfica de cajas y bigotes de los datos

	Frecuencia	Media	Error estándar	Límite inferior	Límite superior
Pet	3	2,588	0,0106684	2,56954	2,60646
Plástico	3	2,57567	0,0106684	2,55721	2,59413
Vidrio	3	2,436	0,0106684	2,41754	2,45446
Total	9	2,53322			

Tabla 70: medias con intervalos LSD (menores diferencias significativas)

Al igual que en los demás estudios esta tabla muestra la media para cada columna de datos. También muestra el error estándar de cada media, que es la medida de su variabilidad en la muestra y el intervalo que incluye cada media.

Estos valores se pueden representar en forma gráfica como se muestra a continuación:



Gráfica 24: Medias y porcentajes (intervalos LSD)

En los Test de Rangos Múltiples, estos intervalos se utilizan para determinar las medias que son significativamente diferentes unas de otras. Estos datos de rangos múltiples se muestran en la siguiente tabla:

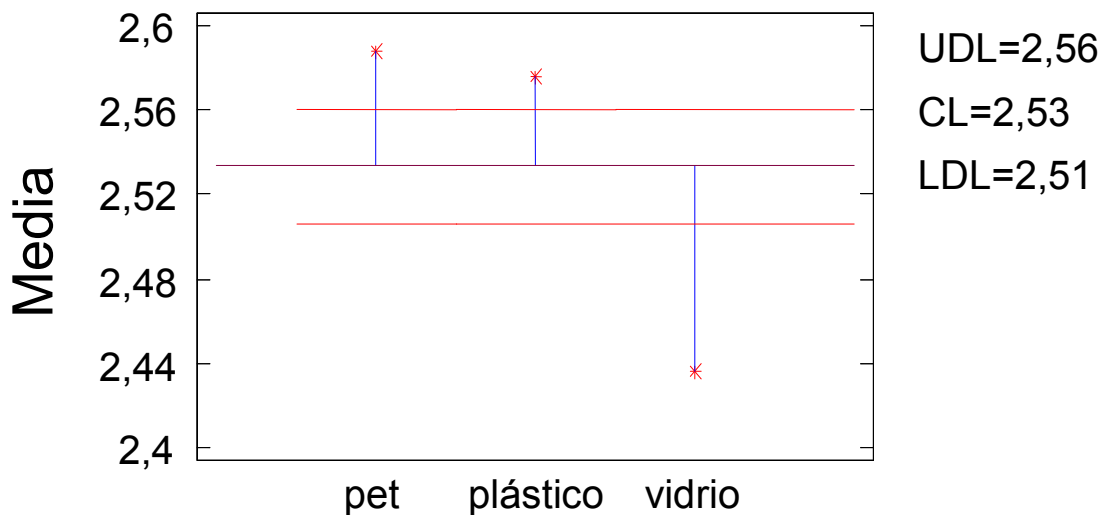
	Frecuencia	Media	Grupos homogéneos
Vidrio	3	2,436	X
Plástico	3	2,575	X
Pet	3	2,588	X
Contraste		Diferencias	+/- Límites
Pet-plástico	0,0123333		0,0369176
Pet-vidrio	*0,152		0,0369176
Plástico-vidrio	*0,139667		0,0369176

Tabla 71: Comparación contraste múltiple de rango. Método 95,0 porcentaje LSD

La tabla 71 aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar las medias que son significativamente diferentes unas de otras. La mitad inferior de la salida muestra la diferencia estimada entre cada par de

medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 2 pares, indica que éstos muestran diferencias estadísticamente significativas a un nivel de confianza 95%. En esta tabla, se identifican 2 grupos homogéneos según la alineación del signo X en la columna. Dentro de cada columna, los niveles que tienen signo X forman un grupo de medias entre las cuales no hay diferencias estadísticamente significativas. El método actualmente utilizado para discernir entre las medias es el procedimiento de las menores diferencias significativas de Fisher (LSD). Con este método, hay un 5% de riesgo de considerar cada par de medias como significativamente diferentes cuando la diferencia real es igual a 0.

Por lo que a la vista de estos datos podemos pensar a priori que los valores de concentración de las muestras envasadas en vidrio son inferiores y presentan diferencias significativas con los otros dos tipos de envase. Aunque haría falta más estudios que corroborasen tal afirmación.



Gráfica 25: análisis de medias de los diferentes tipos de envase con un 95% de límites de decisión.

Datos y estudio estadístico del segundo ensayo a los tres meses:

Los valores de concentración obtenidos en este segundo ensayo apenas superaron la diferencia de $\pm 5\%$ (94,61% para el envase de vidrio). Al igual que en el primer ensayo hemos realizado un estudio estadístico comparativo entre las riquezas obtenidas en cada envase. Los valores se muestran a continuación:

Resumen del Procedimiento.

Muestra 1: envase de pet

Muestra 2: envase de plástico

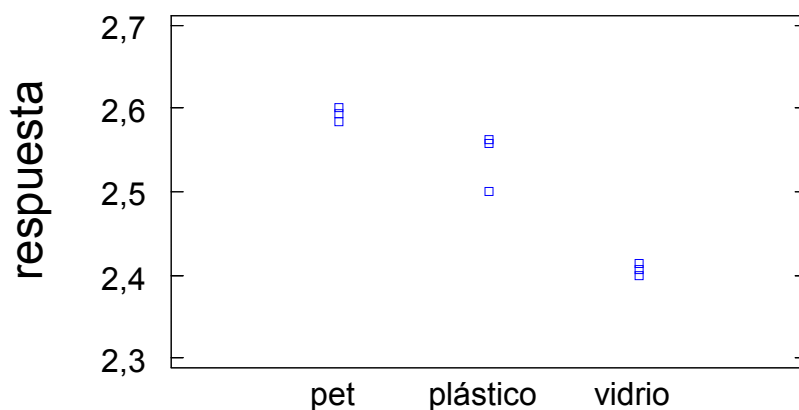
Muestra 3: envase de vidrio

Muestra 1: 3 valores 2,583 hasta 2,601

Muestra 2: 3 valores 2,501 hasta 2,562

Muestra 3: 3 valores 2,4 hasta 2,414

Al igual que en el estudio a tiempo 0 se comparan los datos en 3 columnas de los valores de concentración de cada tipo de envase. Se realizan varios test estadísticos y gráficos para comparar las muestras y el F-test en la tabla de ANOVA comprobará si hay alguna diferencia significativa entre las medias.

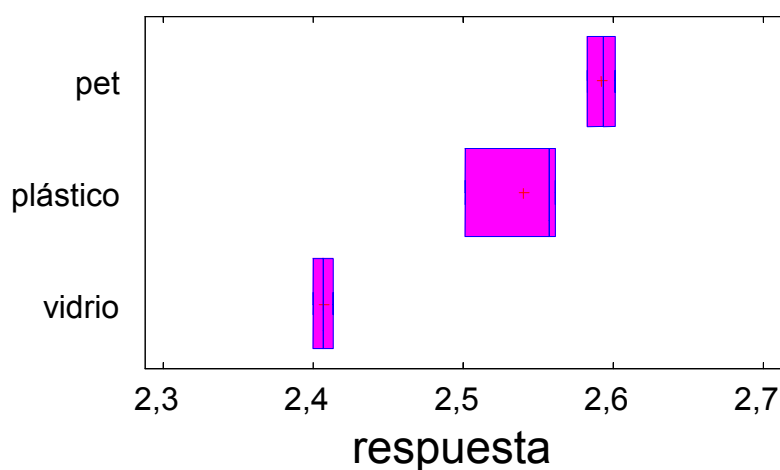


Gráfica 26: dispersión de las muestras 1, 2 y 3.

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente-F	p-Valor
Entre grupos	0,0547762	2	0,0273881	64,32	0,0001
Intra grupos	0,00255467	6	0,000425778		
Total (Corr.)	0,0573309	8			

Tabla 72: Análisis de la varianza

La tabla 72 descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro de cada grupo. El F-ratio, que en este caso es igual a 64,32, es el cociente de la estimación entre grupos y la estimación dentro de los grupos. Puesto que el p-valor del test F es inferior a 0,05, hay diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 3 variables a un nivel de confianza del 95%.

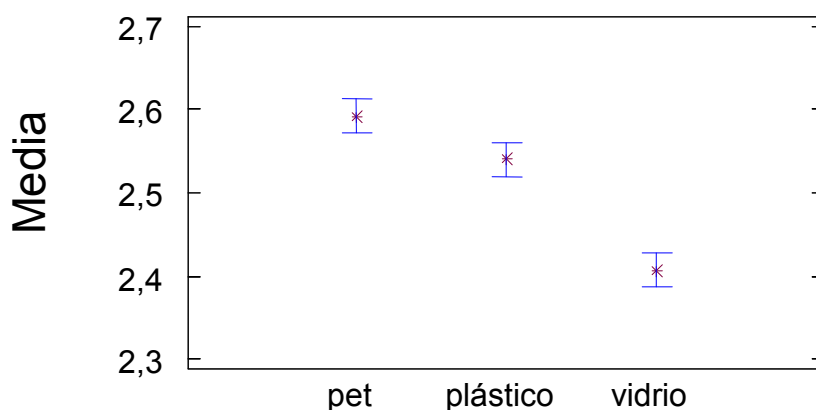
**Gráfica 27:** Gráfica de cajas y bigotes de los datos

	Frecuencia	Media	Error estándar	Límite inferior	Límite superior
Pet	3	2,59233	0,0119133	2,57172	2,61295
Plástico	3	2,54	0,0119133	2,51939	2,56061
Vidrio	3	2,407	0,0119133	2,38639	2,42761
Total	9	2,51311			

Tabla 73: medias con intervalos LSD (menores diferencias significativas)

Al igual que en los demás estudios esta tabla muestra la media para cada columna de datos. También muestra el error estándar de cada media, que es la medida de su variabilidad en la muestra y el intervalo que incluye cada media.

Estos valores se pueden representar en forma gráfica como se muestra a continuación:



Gráfica 28: Medias y porcentajes (intervalos LSD)

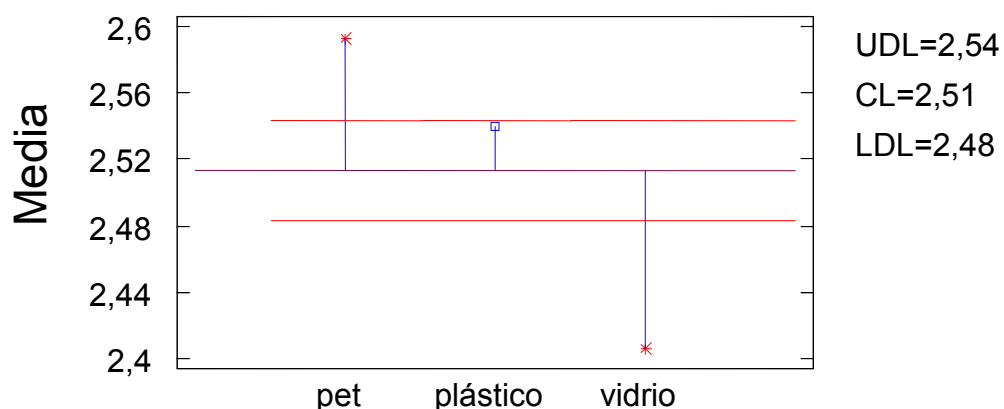
En los Test de Rangos Múltiples, estos intervalos se utilizan para determinar las medias que son significativamente diferentes unas de otras. Estos datos de rangos múltiples se muestran en la siguiente tabla:

	Frecuencia	Media	Grupos homogéneos
Vidrio	3	2,407	X
Plástico	3	2,54	X
Pet	3	2,59233	X
Contraste		Diferencias	+/- Límites
Pet-plástico	*0,0523333		0,0412254
Pet-vidrio	*0,185333		0,0412254
Plástico-vidrio	*0,133		0,0412254

Tabla 74: Comparación contraste múltiple de rango. Método 95,0 porcentaje LSD

La tabla 74 aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar las medias que son significativamente diferentes unas de otras. La mitad inferior de la salida muestra la diferencia estimada entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 3 pares, indica que éstos muestran diferencias estadísticamente significativas a un nivel de confianza 95%. En esta tabla se identifican 3 grupos homogéneos según la alineación del signo X en la columna. Dentro de cada columna, los niveles que tienen signo X forman un grupo de medias entre las cuales no hay diferencias estadísticamente significativas. El método actualmente utilizado para discernir entre las medias es el procedimiento de las menores diferencias significativas de Fisher (LSD). Con este método, hay un 5% de riesgo de considerar cada par de medias como significativamente diferentes cuando la diferencia real es igual a 0.

Por lo que a la vista de estos datos los valores de concentración de las muestras presentan diferencias estadísticamente significativas entre los tres tipos de envases, si bien es cierto que las muestras envasadas en vidrio presentaron menor concentración.



Gráfica 29: análisis de medias de los diferentes tipos de envase con un 95% de límites de decisión.

Estudio microbiológico

Las soluciones de sulfato de cobre preparadas con agua purificada a las proporciones que marca el Formulario Nacional y envasadas en frascos de plástico valona y almacenadas a 30 – 35 °C durante 48 – 72 horas para las bacterias y a 20 – 25 °C durante 5 días para los hongos, no presentan crecimiento bacteriano ni de hongos significativo en ninguno de los períodos de tiempo evaluados.

CAPÍTULO III.**SOLUCIÓN DE EOSINA AL 2 %****INTRODUCCIÓN**

La solución de eosina al 2% se recoge, al igual que la solución de minoxidil, en la primera actualización de la primera edición del FN en el año 2007. Es también un preparado oficial de larga tradición en la oficina de farmacia.

No hemos encontrado estudios sobre la estabilidad de este preparado oficial. Este producto se prepara a partir de eosina disódica.

Al igual que con la solución de sulfato de cobre el período de validez que se establece para soluciones de uso externo sin conservante es de 2 semanas sin embargo el plazo de validez que se establece en el FN es de 7 días en condiciones óptimas de conservación.

La eosina es un colorante de uso muy extendido en la industria, desde la industria textil, cosmética y hasta en el ámbito de la biología e histología. En la oficina de farmacia se ha utilizado también desde hace muchos años como componente de diferentes formulaciones (63 y 64).

PARTE TEÓRICA

1. FARMACOLOGÍA

1.1. ACCIÓN TERAPÉUTICA. INDICACIONES

La eosina es un agente colorante con propiedades bacteriostáticas y fotodinámicas, que sensibiliza la piel a la radiación ultravioleta A, careciendo de efecto farmacológico si la zona de aplicación no se expone a la luz solar directa o a radiaciones UVA.

Se emplea por vía tópica como antiséptico y por su acción fotodinámica en la fototerapia de los carcinomas, lupus, tuberculosis testicular, tricoficia, escrofulodermia, úlcera corrosiva, de decúbito, etc., aplicándose en forma de soluciones, a concentraciones del 2 – 3%. También se emplea para aumentar la acción de otros medicamentos como cloruro mercurico, sales de quinina, etc.

Se emplea en pincelaciones, en el tratamiento de la psoriasis vulgar, asociado con irradiaciones ultravioletas.

Se utiliza como colorante de comprimidos, para colorear y distinguir las soluciones preparadas con ellos.

En la industria cosmética se usa como colorante en lápices labiales y lacas de uñas, aunque han originado numerosas dermatitis. También se emplea como testigo para evaluar las reacciones alérgicas de un cosmético.

La eosina se emplea también para la realización de diferentes fórmulas magistrales como por ejemplo, soluciones acuosas e hidroalcohólicas entre el 0,5 y el 2%. (12, 13 y 64), solución de Eosina – Crisarobina compuesta y pasta al agua con eosina, entre las más habituales.

1.2. POSOLOGÍA

Las soluciones de eosina se aplicarán una o dos veces al día.

1.3. PRECAUCIONES

Las soluciones que contengan eosina no se deben aplicar en la zona ocular. (13)

No deben utilizarse en mucosas. No debe usarse en heridas extensas y profundas. En niños menores de 30 meses utilizar sólo bajo prescripción facultativa. Aunque es improbable la absorción sistémica, no debe utilizarse durante el embarazo o lactancia, salvo criterio médico. Cuando se utilizan las soluciones de eosina para tratar infecciones cutáneas leves no debe exponerse al sol la zona tratada.

1.4. REACCIONES ADVERSAS

Puede causar erupciones cutáneas y reacciones de hipersensibilidad y fotosensibilización. (13)

1.5. INTERACCIONES CON OTROS MEDICAMENTOS

Cuando se utilizan las soluciones de eosina se debe evitar el empleo simultáneo o sucesivo del producto con otras soluciones de antiséptico de acción local. También es incompatible con agentes oxidantes o ácidos.

1.6. CONSERVACIÓN

En un recipiente hermético.

2. DATOS FÍSICO-QUÍMICOS

2.1. N° CAS

La eosina está descrita en la farmacopeas francesa. El número CAS, Código del Chemical Abstracts Service de la eosina es el 17372-87-1.

2.2. ESTRUCTURA QUÍMICA

La eosina se presenta como un polvo rojo-amarillento con fluorescencia verdosa o cristales rojos con un tinte azulado. Fórmula molecular: $C_{20}H_6Br_4Na_2O_5$ y tiene un peso molecular de 691,86.

La eosina disódica es una mezcla de colorantes obtenida mediante la bromación de la fluoresceína que contiene esencialmente la sal disódica de la 2',4',5',7'- tetrabromo-fluoresceína.

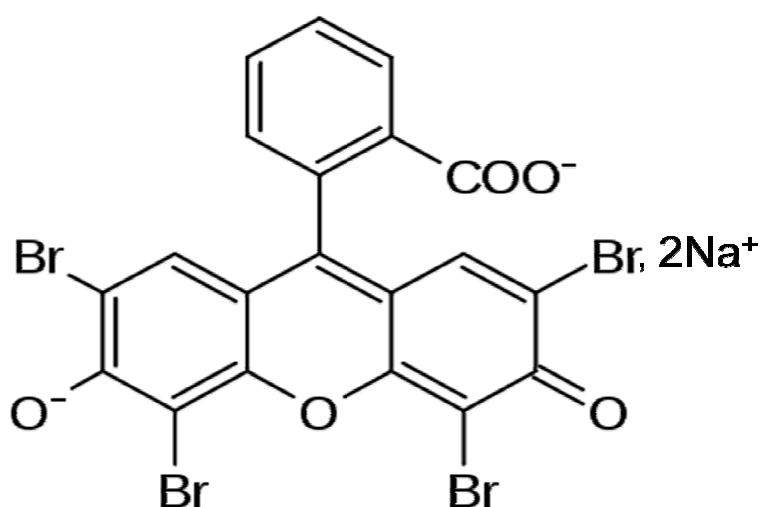


Figura 3. Eosina

Sinonimias

Eosina amarillenta. Ácido bromofluoresceico. Bromoeosina. CI Rojo ácido 87. Colour index nº 45.380. Eosina disódica. Eosina Y. Rojo NYC nº 22. Tetrabromofluoresceína disódica. Tetrabromofluoresceína sódica. Tetrabromofluoresceína soluble.

2.3. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS

La eosina disódica contiene un mínimo del 87 % y un máximo del 93,6 % de colorantes xantínicos, calculado como sustancia desecada.

La eosina es un polvo fino de color rojo, higroscópico, muy soluble en agua (25 g /L), poco soluble en alcohol, prácticamente insoluble en éter. Una solución acuosa de eosina disódica presenta una coloración roja; examinada con luz ultravioleta a 365 nm, presenta una fluorescencia amarillo verdosa. (63)

Es incompatible con agentes oxidantes y ácidos.

Se debe almacenar en recipientes herméticamente cerrados.

Las disoluciones se deben conservar protegidas de la luz.

2.4. ESTABILIDAD Y ALMACENAMIENTO

La eosina como producto químico sin diluir es estable al menos 4 años según el certificado de análisis.

Conforme al Formulario Nacional la solución acuosa de eosina al 2% tiene un plazo de validez de 7 días en condiciones óptimas de conservación (12).

2.5. REACCIONES DE IDENTIFICACIÓN

Una solución acuosa concentrada de la sustancia que se examina presenta una coloración rojo-parduzca oscura.

El formulario español de farmacia militar establece los siguientes métodos de identificación (60):

- a. Una disolución acuosa de problema al 0,2% (p/v) es de color amarillo a rojo-púrpura, con fluorescencia verde-amarillenta.
- b. Una solución alcohólica de producto al 1/12.000 (p/v) muestra una coloración de rosada a rojo-púrpura, con fluorescencia amarillo-verdosa.
- c. Cuando se añaden ácidos minerales a una disolución acuosa al 1% se produce un precipitado anaranjado.
- d. Si a la misma solución de la prueba anterior se le adiciona una disolución saturada de hidróxido sódico al 42% (p/v), se obtiene un precipitado rojo.

La Farmacopea Francesa establece los siguientes métodos de identificación (65):

A. Examinar a la luz del día los cromatogramas obtenidos en el ensayo de “Sustancias relacionadas”. La mancha principal del cromatograma obtenido con la solución a examinar (*b: ver apartado sustancias relacionadas*) es similar en cuanto a posición y coloración a la mancha principal del cromatograma obtenido con la solución testigo.

B. La solución S (ver Ensayo) es rojo sangre. Diluida a 1/10, se vuelve naranja y aparece rosa en capa fina. Diluida a 1/100, presenta una intensa fluorescencia amarillo-verdosa en luz ultravioleta a 365 nm.

C. A 5 ml de solución S, añadir 5 ml de agua y 2,5 ml de ácido nítrico 0,1 N. Se forma un precipitado naranja. Filtrese. Recójase el filtrado y el precipitado.

D. Calcine 0,1 g del precipitado obtenido en la identificación C con 1 g de carbonato potásico R. Deje enfriar y recoja el residuo con 5 ml de agua. Filtre. El filtrado da la reacción (b) de bromuros (V.3.1.1).

E. El residuo obtenido en el ensayo “Cenizas sulfúricas” da la reacción (b) del sodio (V.3.1.1).

Los ensayos que se establecen en la Farmacopea Francesa son los siguientes:

Solución S. Disuelva 1,00 g de eosina disódica en agua y complete hasta 100, ml con el mismo disolvente.

Productos insolubles en agua

Disuelva 2,0 g de eosina disódica en 200 ml de agua calentando hasta 90°C. Deje enfriar, después filtre sobre un filtro de vidrio sinterizado (16) previamente secado a 100-105°C y tarado. Lave con el agua hasta la obtención de un filtrado incoloro, después seque a 100-105°C hasta masa constante. La masa del residuo no es superior a 4 mg (0,2 por ciento)

Productos extraíbles por éter

Utilice éter anhidro R. En un frasco calibrado de 200 ml, introduzca 2,0 g de eosina disódica previamente secada al vacío a 60°C (V.6.22) y complete hasta 200 ml con éter anhidro R. Agite mecánicamente durante 30 min. Filtre. Recoja 100 ml de filtrado y evapore a sequedad bajo vacío a 20°C como máximo. Deseque el residuo en un desecador hasta tener masa constante. La masa del residuo no es superior a 5 mg (0,5 por ciento).

Cloruros

A 1,25 ml del filtrado obtenido en la identificación C, añada 13,75 ml de agua. La solución cumple con el ensayo límite de cloruros (V.3.2.4).

Sustancias relacionadas

Analice por cromatografía en capa fina (V.6.20.2) utilizando una placa recubierta de gel de sílice G R.

Solución a examinar (a). Solución S.

Solución a examinar (b). Tome 2 ml de solución S y complete hasta 100 ml con agua.

Solución testigo (a). Disuelva 100 mg de eosina disódica SCR fr en agua y complete hasta 10 ml con el mismo disolvente.

Solución testigo (b). Tome 4 ml de solución testigo (a) y complete hasta 10 ml con agua.

Solución testigo (c). Tome 1 ml de solución testigo (a) y complete hasta 10 ml con agua.

Solución testigo (d). Tome 2 ml de solución testigo (c) y complete hasta 10 ml con agua.

Deposite por separado sobre la placa 5 µl de cada solución. Desarrolle en una longitud de 15 cm con una mezcla de 35 volúmenes de ácido acético glacial R y de 65 volúmenes de tolueno R. Deje secar la placa al aire. Introduzca la placa durante 5 minutos en una cuba de cristalografía en la que hayan sido colocados previamente durante 30 min, 2 cristalizadores de 5 cm de diámetro conteniendo cada uno 1 ml de agua de bromo R. Examine a la luz del día. Si aparecen otras manchas distintas de la mancha principal en el cromatograma obtenido con la solución a examinar (a) ninguna de ellas es más intensa que la mancha principal del cromatograma obtenido con la solución testigo (b); solamente una de ellas puede ser más intensa que la mancha principal del cromatograma obtenido con la solución testigo (c) y 3 de ellas pueden ser más intensas que la mancha principal del cromatograma obtenido con la solución testigo (d).

Pérdida por desecación (V.6.22) Determinada a 100-105°C en 1,000 g de eosina disódica, la pérdida por desecación no es superior al 10%.

Cenizas sulfúricas (V.3.2.14). Determinado en 1,0 g de eosina disódica, el nivel de cenizas sulfúricas es del 20 al 23%, calculado en relación con la sustancia seca.

En un frasco cónico de 500 ml, introduzca 50 ml de solución S. Caliente hasta ebullición. Añada 25 ml de ácido clorhídrico R al 2 por ciento V/V y lleve de nuevo a ebullición. Enjuague los bordes del frasco con un poco de agua. Cubra con un vidrio de reloj y deje al baño maría durante 1 h. Refrigere a temperatura ambiente. Filtre en vidrio sinterizado previamente tarado. Enjuague 3 veces con 2 ml de ácido clorhídrico R al 0,2 por ciento v/v. Deje secar a 100-105°C hasta masa constante (65).

2.6. MÉTODOS DE ANÁLISIS

2.5.1. MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS

Al igual que en el estudio de minoxidil, se ha utilizado la técnica de espectrofotometría visible para cuantificar la concentración de eosina en solución. Como ya se ha comentado la espectrofotometría uv- vis es uno de los primeros métodos físicos que se aplicó al análisis cuantitativo y que supera al resto de los métodos en cuanto a la facilidad para cuantificar los resultados. No obstante en este caso utilizaremos otras técnicas de apoyo que nos ayuden a confirmar la ausencia de otros posibles productos de degradación en el analito

2.5.2. MÉTODOS DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

La aplicación más importante de la espectroscopía de RMN de protones es la identificación y el esclarecimiento de la estructura de moléculas orgánicas, organometálicas y bioquímicas (66). También se puede utilizar para la determinación cuantitativa. Esta técnica se emplea para la identificación de la eosina como técnica de apoyo y método complementario de la determinación cuantitativa por espectrofotometría visible. Se entiende que si se compara el producto problema con un patrón elaborado en el momento y los espectros son iguales, cumplimos con la exigencia de pureza y selectividad del método.

2.5.3. MÉTODOS DE INFRARROJOS

Las aplicaciones de la espectrofotometría en el infrarrojo se dividen en tres grandes categorías relacionadas con tres regiones espectrales (67). La región más ampliamente utilizada es la del infrarrojo medio, que se extiende desde casi 670 hasta 4000 cm^{-1} (2,5 y 14,9 μm), que es la que se ha utilizado en este estudio.

Al igual que la técnica anterior la aplicación más importante de la espectrofotometría de absorción y reflexión en el infrarrojo medio es la determinación de la estructura de especies orgánicas.

En el análisis cualitativo, el número, posición e intensidad relativa de las bandas de absorción son características de un compuesto, por tanto, si dos espectros son exactamente iguales puede decirse que se trata del mismo compuesto. La interpretación de un espectro IR es relativamente sencilla con la ayuda de tablas y catálogos (68). Por otro lado es particularmente útil la región de la huella dactilar, comprendida entre 1200 cm^{-1} y 600 cm^{-1} , debido a que pequeñas diferencias en la estructura y la constitución de una molécula causan cambios importantes en el aspecto y la distribución de las bandas de esta región. Por tanto, una gran similitud en la región de huella dactilar (así como en otras) de los espectros de dos compuestos constituye una evidencia casi certera de que son idénticos. (69). En nuestro estudio se utiliza esta técnica como método complementario a la espectrofotometría visible.

PARTE EXPERIMENTAL

3. MATERIALES

3.1. MATERIAS PRIMAS

Eosina amarillenta. Laboratorio Fagron Ibérica S.A.U.

3.2. CERTIFICADO DE ANÁLISIS

En el caso de la materia prima eosina, se han tomado como referencia las especificaciones establecidas en la Farmacopea Francesa (65).

Su riqueza estará comprendida entre el 87 por ciento y el 93,6 por ciento de $C_{20}H_6Br_4Na_2O_5$.

Sus características físicas ya han sido descritas en el punto anterior.

Nuestro producto tiene también como proveedor a la compañía Fagron que aporta el siguiente certificado de análisis:

FAGRON IBERICA S.A.U · JOSEP TAPIOLAS,150 · ES-08226 TERRASSA · BARCELONA
 Tel 937310722
 Fax 937311644
www.fagron.es

Pg. 1
 20 – Febrero 2009

Certificado de Análisis

EOSINA

PM	691,86	Próximo Control Analítico	30/10/13
Nº CAS	17372-87-1	Nº Análisis	BA-01696
NºProducto	30554-0	Nº Lote	08J21-B09
Fecha Conclusión	20/02/09	Cod Muestra	M-003862
		Calidad Final	PF

INCI

Características

Polvo fino rojo. Soluble en agua (25 g/l) y en etanol.

ENSAYOS	ESPECIFICACIONES	RESULTADOS	METODO
Identificación	Test A, B, C, D, E	Conforme	A0130554-00
Sustancias relacionadas	Test PF	Conforme	A0730554-00
Pérdida por desecación	< 10 %	2 %	A0830554-00
Riqueza	87 – 93,6 %	89,2 %	A1030554-00
Cenizas sulfúricas	20,0 – 23,0 %	21,2 %	A1330554-00
Cloruros	Test PF	Conforme	A1930554-00
Materia insoluble en agua	< 02 %	0,1 %	A2630554-00
Sustancias insolubles en éter	< 0,5%	< 0,1 %	AEC30554-00

Conservación

En envase bien cerrado, protegido de la luz

Anna Codina
 Directora Técnica Farmacéutica

3.3. INSTRUMENTAL DE LABORATORIO

Balanza, sartorius BP 310 P

Balanza, sartorius BP 2100

Matraces aforados de vidrio de 1000 ml, 100 ml y 50 ml

Teflón de agitación

Espectrofotómetro BECKMAN DU7.

Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear del Servicio de RMN
 de la U.C.M. Modelo Bruker AC-250 a 250 MHz para RMN-¹H

Espectroscopia de Infrarrojos FT-Perkin Elmer Paragon 1000

Micropipeta automática Easy 40+ 0,5-5 ml (EASD-5KP-001)

Placas Petri con agar caseína-soja

Placas Petri con agar glucosa de Sabouraud
Estufa programada a 25° C
Estufa programada a 40° C
Estufa programada a 20 - 25° C
Estufa programada a 30 - 35° C
Filtros Millipore® de 0,45 µm de diámetro de poro
Aparatos de filtración estéril
Pipetas estériles de 1 ml y 10 ml
Pinzas estériles
Bomba de vacío
Tubos de ensayo de vidrio con algodón
Gradillas
Viales de vidrio topacio de 5 ml
Tapones de goma
Alicates cierra viales
Frascos de plástico topacio
Liofilizador

3.4. REACTIVOS

Agua purificada. Laboratorio Fagron S.A.
Diluyente y líquido de lavado Millipore® (solución de peptona y cloruro sódico tamponada a pH 7) (33).
Dimetilsulfóxido.

4. MÉTODOS Y RESULTADOS

4.1. CARACTERIZACIÓN DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS

De igual que en los dos estudios anteriores se procedió a la observación directa de la materia prima para comprobar que el aspecto es el que se describe en la farmacopea o en las fuentes bibliográficas adecuadas. Se observó su apariencia externa color, textura y olor.

4.2. RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DE LOS CARACTERES ORGANOLÉPTICOS

La eosina es un polvo fino de color rojo, soluble en 3 partes de agua y 50 partes de alcohol; prácticamente insoluble en cloroformo y en éter.

4.3. VALORACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA UV. VALIDACIÓN ANALÍTICA.

Se ha procedido a realizar también para este estudio de la solución de eosina una validación del método con los criterios utilizados en la espectrofotometría UV-Visible por lo que se han determinado igualmente los parámetros de:

- Linealidad (Límites de detección y confianza, para un grado de confianza del 95%).
- Sensibilidad (Límites de detección y cuantificación).
- Precisión (Repetibilidad y precisión intermedia).
- Robustez

4.4. RESULTADOS DE LA VALORACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA

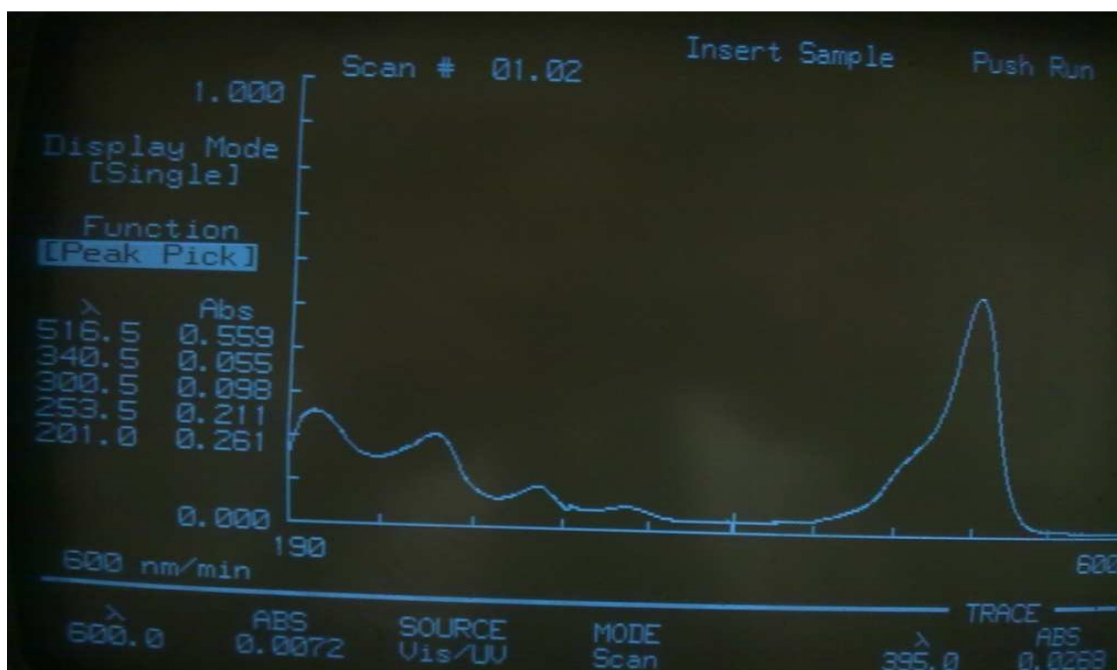
4.4.1. LINEALIDAD

La concentración de eosina como preparado oficial es también del 2%, lo que equivale a 20 mg/ml. Se realizaron diferentes muestras independientes a

diferentes concentraciones. Se comprobó previamente que la concentración a la que se obtenían lecturas de absorbancia no saturadas era entorno a los 4 $\mu\text{g/ml}$. Las concentraciones elegidas de las que se partió fueron de 12,5; 15; 17,5; 20; 22,5; 25; 27,5; y 30 mg/ml (concentraciones que equivalen al 1,25%, 1,5%, 1,75%, 2%, 2,25%, 2,5%, 2,75% y 3%) .

A partir de estas concentraciones se realizaron las correspondientes diluciones de la siguiente manera: de cada muestra se tomó 1 ml y se diluyó hasta 100 ml en un matraz aforado con el disolvente, en este caso agua purificada, después de cada muestra obtenida (concentraciones diluidas 1/100) se volvió a tomar 1 ml y se diluyó otra vez hasta 50 ml con agua purificada. Las concentraciones finales obtenidas fueron de 2,5; 3; 3,5; 4; 4,5; 5; 5,5; y 6 $\mu\text{g/ml}$. Este proceso se realizó por cuadruplicado.

Se realizó un barrido espectral en un intervalo de 190 a 600 nm (ver gráfica 30) para detectar la longitud de onda de máxima absorción de la solución de eosina a una concentración de 4 $\mu\text{g/ml}$. El resultado fue que el pico de máxima absorción se obtuvo a una longitud de onda de 516,5 nm, por lo que se midieron a esta longitud de onda las absorbancias de las diluciones preparadas y se procedió a su estudio estadístico para ver si la relación obtenida entre concentraciones y absorbancias era significativa y si había para este intervalo de concentraciones linealidad entre los dos factores.



Gráfica 30: Barrido de máxima absorción espectrofotométrica. 190 – 600 nm.

λ	absorbancia
516,5	0,559
340,5	0,055
300,5	0,098
253,5	0,211
201	0,261

Tabla 75: Valores del barrido espectrofotométrico.

Se obtuvo un pico de absorción a 516,5 nm. Después se procedió a la realización de las diferentes diluciones en el disolvente descrito anteriormente.

En la tabla 76 se muestran los valores obtenidos de las absorbancias de cada muestra y los valores de factores respuesta. (dividiendo la absorbancia por la concentración.)

Eosina en sol. acuosa		$\lambda = 516,5 \text{ nm}$	
Concentración	nº prueba	Absorbancia	factor resp.
2,5 µg/ml	1	0,3480	0,1392
	2	0,3542	0,1417
	3	0,3418	0,1367
	4	0,3398	0,1359
3 µg/ml	1	0,4181	0,1394
	2	0,4303	0,1434
	3	0,4225	0,1408
	4	0,4124	0,1375
3,5 µg/ml	1	0,4772	0,1363
	2	0,4730	0,1351
	3	0,4658	0,1331
	4	0,4916	0,1405
4 µg/ml	1	0,5486	0,1372
	2	0,5573	0,1393
	3	0,5321	0,1330
	4	0,5479	0,1370
4,5 µg/ml	1	0,6169	0,1371
	2	0,6124	0,1361
	3	0,6047	0,1344
	4	0,6164	0,1370
5 µg/ml	1	0,6844	0,1369
	2	0,6812	0,1362
	3	0,6737	0,1347
	4	0,6697	0,1339
5,5 µg/ml	1	0,7432	0,1351
	2	0,7437	0,1352
	3	0,7437	0,1352
	4	0,7542	0,1371
6 µg/ml	1	0,8098	0,1350
	2	0,8025	0,1338
	3	0,8067	0,1345
	4	0,8209	0,1368

Tabla 76. Resultados obtenidos en el ensayo de linealidad entre valores de absorbancia frente a concentración de eosina

A continuación se muestran los resultados de ajuste del modelo lineal para describir la relación existente entre la absorbancia y la concentración del fármaco.

	absorbancia	95%		95%	
Concentración	Predicho	Límites de predicción		Límites de confianza	
X	Y	Inferior (U.A.)	Superior(U.A.)	Inferior(U.A.)	Superior(U.A.)
2,5	0,3486	0,3322	0,3649	0,3435	0,3536
6,0	0,8104	0,7940	0,8268	0,8054	0,8154

Tabla 77. Límites de predicción y confianza para el valor mínimo y máximo de la recta de calibrado.

Los resultados del Análisis de la varianza (ANOVA) realizado sobre la pendiente y la ordenada de la recta de calibrado, se muestran en la tabla 79.

Análisis de Regresión - Modelo Lineal $Y = a + b \cdot X$

Variable dependiente: absorbancia

Variable independiente: concentración

Parámetro	Estimación	Error estándar	Estadístico T	p- valor
Ordenada	0,01870	0,0051	3,612	0,0011
Pendiente	0,13196	0,0011	112,188	0,0000

Tabla 78: Parámetros de regresión lineal de la absorbancia frente a la concentración.

Dado que el p-valor en la tabla ANOVA es inferior a 0,01, existe una relación estadísticamente significativa entre absorbancia y concentración para un nivel de confianza del 99%.

El estadístico R^2 indica que el modelo explica un 99,76% de la variabilidad en absorbancias. El coeficiente de correlación es igual a 0,998, indicando una relación relativamente fuerte entre las variables. El error estándar de la estimación muestra la desviación típica de los residuos que es 0,0076. Este valor se usa para construir los límites de la predicción para las nuevas observaciones.

Análisis de la varianza

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente – F	p- Valor
Modelo	0,7313	1	0,731339	12586,16	0,0000
Residuo	0,0017	30	0,000058		
Falta de ajuste	0,00025	6	0,000042	0,69	0,6591
Error puro	0,00148	24	0,0000619		
Total (Corr.)	0,73308	31			

Tabla 79: ANOVA

Coefficiente de Correlación = 0,99881

R-cuadrado = 99,76 porcentaje

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 99,7543 porcentaje

Error estándar de est. = 0,0076

Error absoluto medio = 0,0059

Estadístico de Durbin-Watson = 1,89117 (P=0,3075)

Autocorrelación residual en Lag 1 = 0,022977

Se realizó el test de falta de ajuste para determinar si el modelo seleccionado es adecuado para describir los datos observados o si se debería utilizar un modelo más complicado. El test se realiza comparando la variabilidad de los residuos del modelo actual con la variabilidad entre las observaciones a valores duplicados de la variable independiente X. Dado que el p-valor para la Falta de Ajuste en la tabla 79 (ANOVA) es mayor o igual a 0,10, el modelo parece ser el adecuado para los datos observados

En la tabla 80 se muestra que de los modelos ajustados el modelo lineal proporciona el valor de R^2 más alto con 99,76%, siendo este modelo el más adecuado para los datos observados.

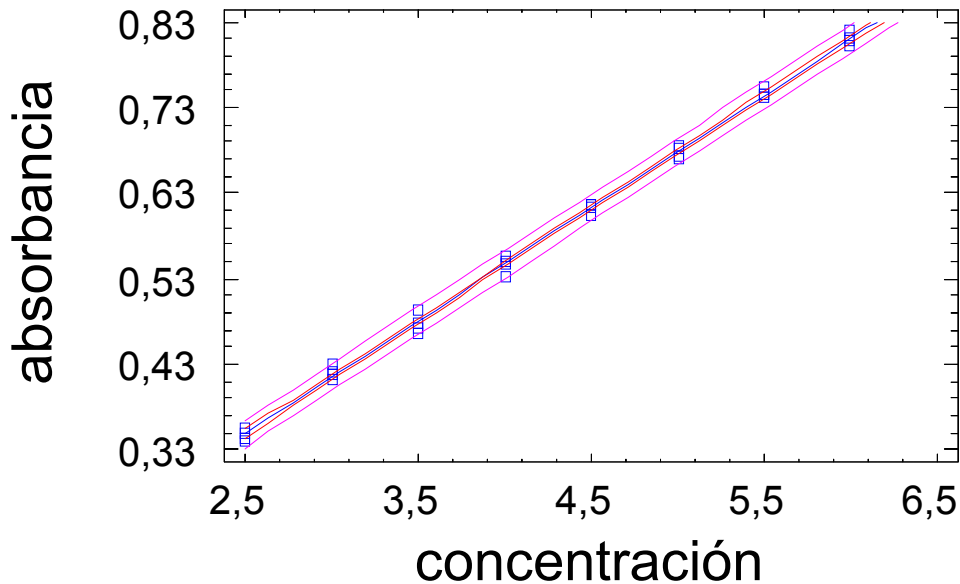
Comparación de Modelos Alternativos

Modelo	Correlación	R-cuadrado
Lineal	0,9987	99,76%
Multiplicativo	0,9980	99,71%
Doble inverso	0,9981	99,62%
Raíz cuadrada-X	0,9969	99,39%
Logístico	0,9969	99,38%
Raíz cuadrada-Y	0,9969	99,37%
Logarítmico-X	0,9912	98,24%
Exponencial	0,9911	98,23%
curva-S	-0,9906	98,12%
Log Probit	0,9854	97,10%
Inverso-X	-0,9682	93,73%
Inverso-Y	-0,9680	93,71%

Tabla 80.

De los modelos que muestra la tabla 80, el modelo lineal procura el valor de R^2 más alto. Por lo tanto, todos los tratamientos estadísticos realizados indican que el método propuesto de espectrofotometría visible es lineal en el intervalo de concentraciones seleccionado.

La ecuación del modelo ajustado es: Absorbancia (U.A.) = 0,0187015 + 0,131958*concentración



Gráfica 31: Regresión lineal de los datos de absorbancia frente a concentraciones obtenidas ($\mu\text{g/ml}$) en el ensayo de linealidad con los límites de confianza del 95%.

En la gráfica 31 se muestra la representación del mejor ajuste lineal entre las absorbancias y las concentraciones (línea azul). Los límites de predicción (líneas rojas internas) corresponden a las hipérbolas de la gráfica más cercanas a los puntos obtenidos experimentalmente, para un nivel del 95%; y los intervalos de confianza (líneas rosas externas), para un nivel de confianza del 95%, corresponden a las hipérbolas más separadas de los puntos experimentales.

Como se puede observar en la gráfica, todos los puntos de los resultados obtenidos se encuentran dentro de los límites de confianza y predicción.

4.4.2. SENSIBILIDAD

Para el cálculo de los límites de detección y cuantificación se tomaron los valores de 10 muestras de una misma concentración. Se eligió la concentración de 4 µg/ml, y se midieron en el espectrofotómetro a 516,5 nm.

En la tabla 81 se muestran los resultados de la absorbancia de las 10 muestras.

Concentración:
4 µg/ml

Muestras	Absorbancia
1	0,5484
2	0,5486
3	0,5504
4	0,5471
5	0,5476
6	0,5483
7	0,5489
8	0,5479
9	0,5474
10	0,5484
Media	0,5483
D.S.	0,00104
C.V. (%)	0,19 %

Tabla 81: Valores de absorbancia

La fórmula que se emplea para hallar los valores de ambos límites es:

$$CI = (K * S_{bl}) / b$$

Donde

K: Constante que toma valores de tres para el límite de detección y de diez para el límite de cuantificación.

S_{bl}: Desviación estándar de las muestras: 0,00104

b: Pendiente de la recta de calibrado : 0,13196

Los límites calculados son respectivamente

L. Detección: 0,0237 µg/ml

L. Cuantificación: 0,079 µg/ml

4.4.3. PRECISIÓN

Repetibilidad.

Se realizó un mínimo de tres muestras a tres niveles de concentración 3, 4 y 5 $\mu\text{g/ml}$ para cubrir el intervalo especificado. A continuación se leyeron las absorbancias en el espectrofotómetro.

n° de muestra	C = 3 $\mu\text{g/ml}$	C = 4 $\mu\text{g/ml}$	C = 5 $\mu\text{g/ml}$
1	0,4301	0,5563	0,6824
2	0,4311	0,5567	0,6806
3	0,4304	0,5577	0,6814
Media	0,4305	0,5569	0,6815
D.S.	0,0005	0,0007	0,0009
C.V. (%)	0,12%	0,13%	0,13%

Tabla 82. Resultados del estudio de repetibilidad.

El coeficiente de variación nos indica que el método es repetible en el mismo día.

Precisión intermedia.

Se realizaron tres soluciones madre y de cada una de ellas se prepararon cuatro diluciones para tener las concentraciones siguientes: 3, 4, 5 y 6 $\mu\text{g/ml}$ que fueron analizadas en el espectrofotómetro.

Este proceso se repitió en tres días distintos.

	concentraciones			
	3 µg/ml	4 µg/ml	5 µg/ml	6 µg/ml
día 1	0,4301	0,5563	0,6824	0,8016
	0,4311	0,5567	0,6806	0,8043
	0,4304	0,5577	0,6814	0,8010
día 2	0,4124	0,5517	0,6699	0,8217
	0,4126	0,5483	0,6701	0,8207
	0,4123	0,5454	0,6694	0,8206
día 3	0,4170	0,5484	0,6847	0,8093
	0,4191	0,5486	0,6849	0,8090
	0,4180	0,5505	0,6841	0,8103
Media	0,4203	0,5515	0,6786	0,8109
D.S.	0,0080	0,0044	0,0067	0,0082
C.V. (%)	1,91%	0,80%	1,00%	1,01%

Tabla 83. Resultados de la precisión entre los tres días.

Los coeficientes de variación que aparecen en la tabla 83 son menores de 5%, lo que nos confirma que además el método tiene una buena precisión intermedia.

Por lo tanto, podemos afirmar que la recta de calibración obtenida en nuestros ensayos es adecuada y válida para comenzar nuestro estudio posterior de estabilidad.

4.4.4. ROBUSTEZ

Para el cálculo de la robustez se tomaron los valores de 4 muestras de una misma concentración a tiempo 0 y 48 horas después de la elaboración de la muestra. Se eligió la concentración de 4 µg/ml, y se midieron en el espectrofotómetro a 516,5 nm.

conc. 4 µg/ml	Tiempo	
Muestras	t = 0	t = 48 h
1	0,5517	0,5484
2	0,5483	0,5504
3	0,5454	0,5486
4	0,5460	0,5471
% eosina inalterada	100%	100,14%

Tabla 84: valores de robustez

De estos datos se concluye que las muestras pueden ser analizadas durante las 48 siguientes a su preparación.

Por lo tanto una vez realizada la validación del método podemos concluir que el método de análisis es lineal en el intervalo de concentraciones utilizado, fiable, practicable e idóneo. Por lo que nos servirá como método de análisis de las muestras objeto de estudio.

4.5. VALORACIÓN POR RMN

Las medidas espectroscópicas por Resonancia Magnética Nuclear (RMN), se han llevado a cabo en el siguiente instrumento:

- Equipo Bruker AC-250 a 250 MHz del servicio de RMN de la Universidad Complutense de Madrid (UCM).

A partir de las muestras almacenadas en la estufas de 25° C y 40° C se extrae una parte alícuota en cantidad suficiente, posteriormente se realiza una liofilización para extraer el líquido diluyente y dejar una muestra en polvo del principio que se quiere valorar, en este caso de eosina.

Posteriormente se disuelve con Dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d₆) y se incorpora esta disolución en los tubos adecuados.

La cantidad de muestra para realizar un espectro normal de RMN ¹H es de 5 a 10 mg.

El volumen mínimo óptimo de disolvente es de 0,7 ml, lo que equivale a una altura del disolvente en el tubo de 5 cm.

Sólo se emplean tubos enteros normalizados y la longitud mínima de los tubos debe ser de 18 cm.

También se preparan muestras a partir de la eosina polvo para obtener una muestra patrón y poder comparar los distintos espectros.

Por último los tubos deben estar perfectamente limpios por fuera y deben ir identificados.

4.6. RESULTADOS DE LA VALORACIÓN POR RMN

Los datos obtenidos se muestran a continuación:

Espectros RMN de ^1H para las muestras patrón de eosina.

En la figura 5 se muestra el espectro de ^1H -RMN de la muestra patrón de eosina. Su análisis espectroscópico se describe a continuación:

Se observa en δ 8,09 a 8,13 ppm doblete de dobletes (dd) correspondiente al H-6, en δ 7,53 a 7,56 ppm un multiplete correspondiente a los H 4 y 5, en δ 7,17 a 7,20 ppm un dd correspondiente al grupo H-3 y en δ 7,00 ppm un singlete correspondiente a los H 1 y 8 del anillo del xanteno

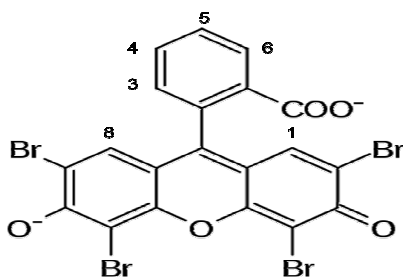


Figura 4: molécula de Eosina

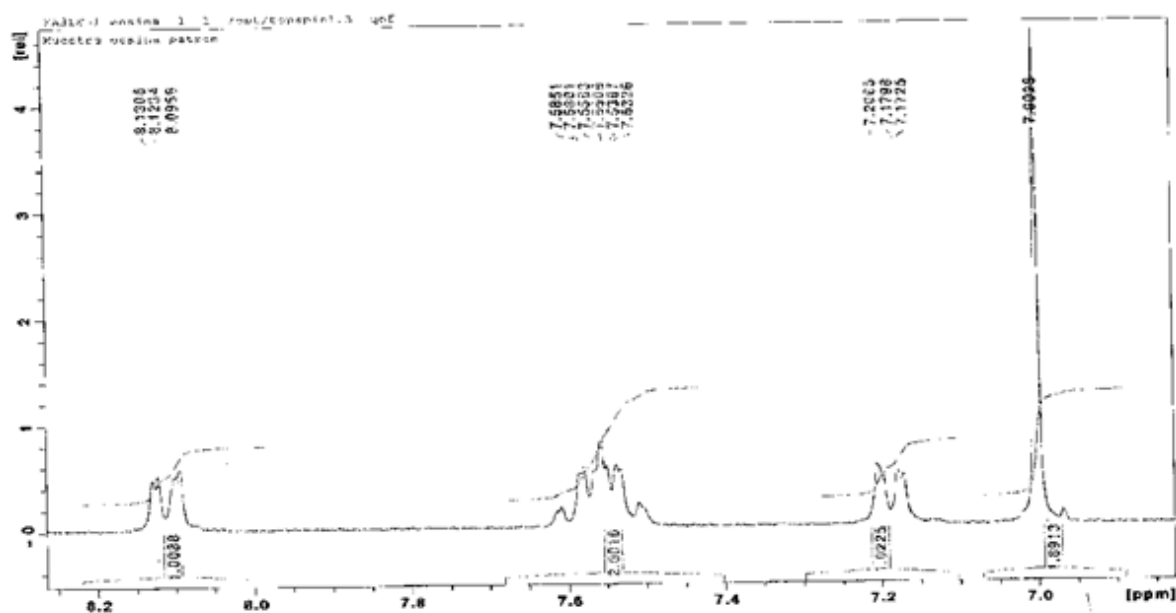


Figura 5: RMN de eosina patrón para el ensayo de 3 meses.

Espectros RMN de ^1H para las muestras almacenadas a 25° durante 3 meses.

En la figura 6 se muestra el espectro de ^1H -RMN de la eosina almacenada a 25 ° C durante tres meses. Su análisis espectroscópico se describe a continuación:

Se observa en δ 8,07 a 8,15 ppm un dd correspondiente al H-6, en δ 7,48 a 7,60 ppm un multiplete correspondiente a los H 4 y 5, en δ 7,17 a 7,20 ppm un dd correspondiente al grupo H-3 y en δ 6,98 a 7,01 ppm un singlete correspondiente a los H 1 y 8 del anillo del xanteno

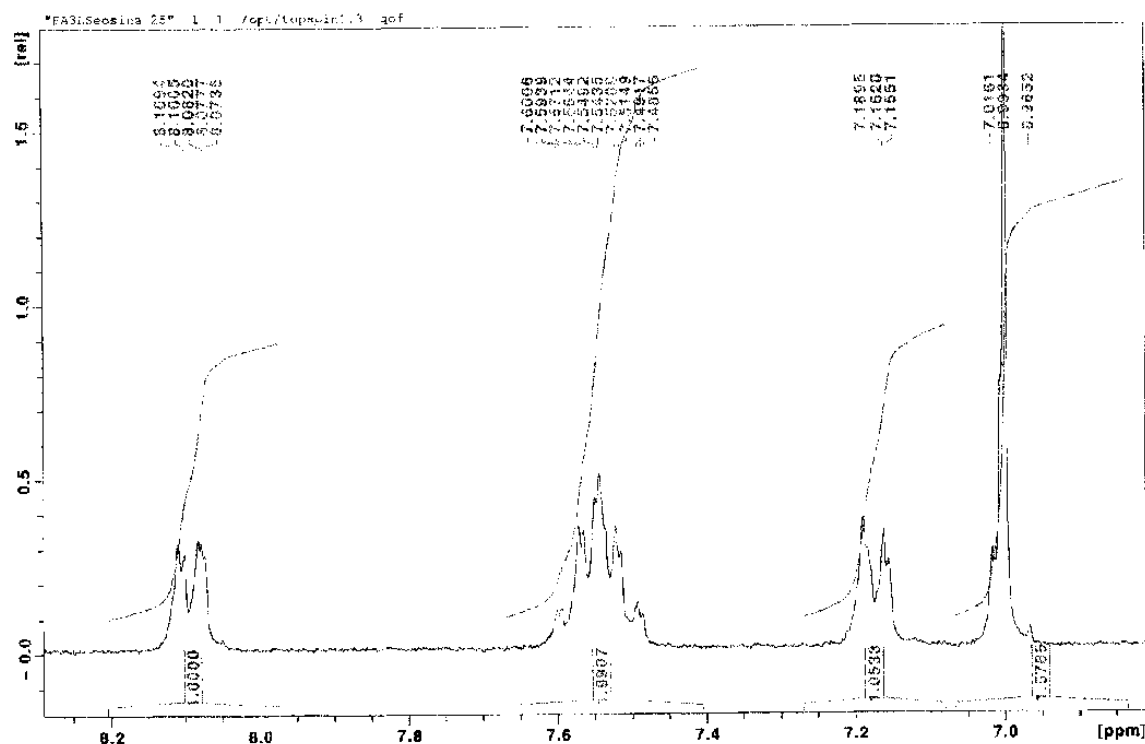


Figura 6: RMN de eosina a los tres meses a 25° C.

Espectros RMN de ^1H para las muestras almacenadas a 40° durante 3 meses.

Se observa en δ 8,06 a 8,10 ppm un dd correspondiente al H-6, en δ 7,49 a 7,59 ppm un multiplete correspondiente a los H 4 y 5, en δ 7,11 a 7,18 ppm un dd correspondiente al grupo H-3 y en δ 6,99 a 7,01 ppm un singlete correspondiente a los H 1 y 8 del anillo del xanteno

Se observa en δ 8,06 a 8,10 ppm un dd correspondiente al H-6, en δ 7,49 a 7,59 ppm un multiplete correspondiente a los H 4 y 5, en δ 7,11 a 7,18 ppm un dd correspondiente al grupo H-3 y en δ 6,99 a 7,01 ppm un singlete correspondiente a los H 1 y 8 del anillo del xanteno

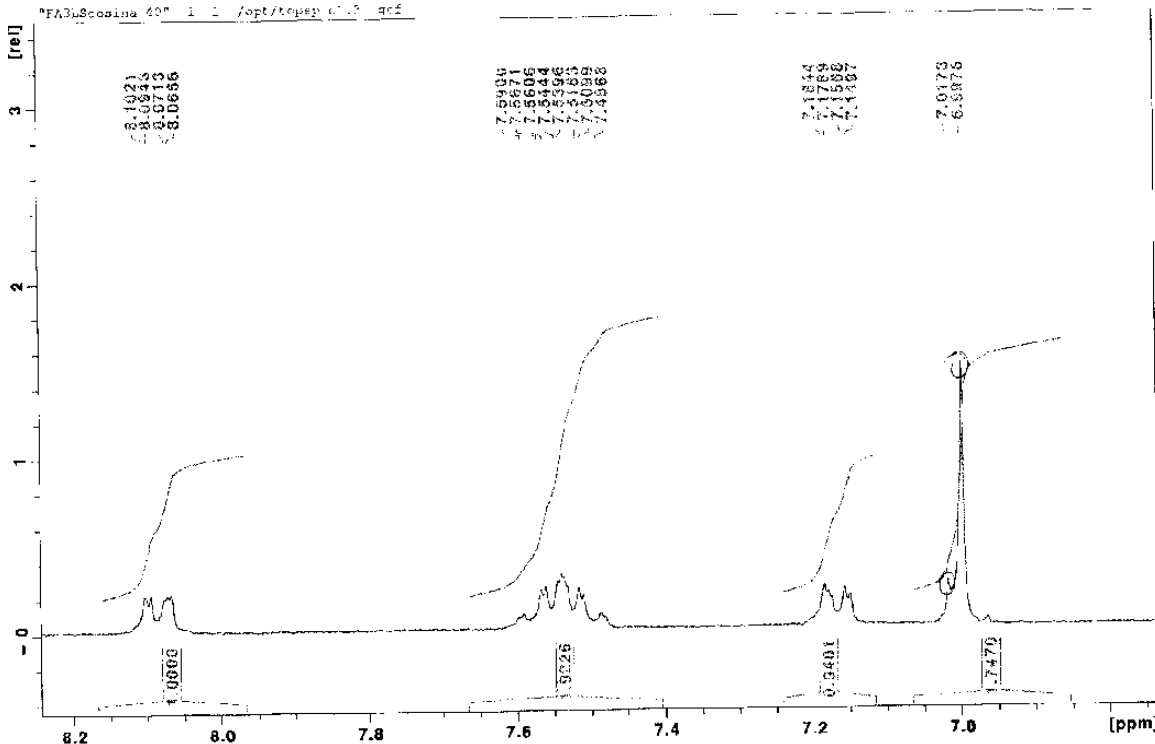


Figura 7: RMN de eosina a los tres meses a 40° C.

Espectros RMN de ^1H para las muestras patrón de eosina. Ensayo a los 6 meses.

En la figura 8 se muestra el espectro de ^1H -RMN de la muestra patrón de eosina analizada a los 6 meses de almacenamiento de las muestras objeto de estudio. Su análisis espectroscópico se describe a continuación:

Al igual que con el patrón ensayado a los tres meses se observa en δ 8,09 a 8,12 ppm un dd correspondiente al H-6, en δ 7,532 a 7,58 ppm un multiplete correspondiente a los H 4 y 5, en δ 7,16 a 7,20 ppm un dd correspondiente al grupo H-3 y en δ 7,00 ppm un singlete correspondiente a los H 1 y 8 del anillo del xanteno

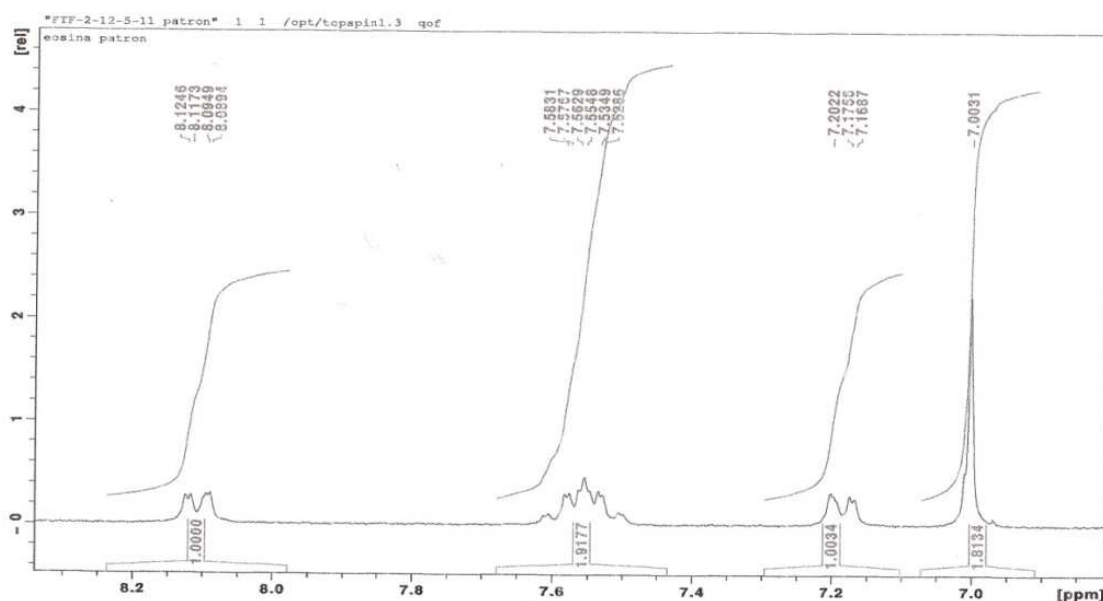


Figura 8: RMN de eosina patrón para el ensayo de 6 meses.

Espectros RMN de ^1H para las muestras almacenadas a 25° durante 6 meses.

En la figura 9 se muestra el espectro de 1H-RMN de la eosina almacenada a 25 ° C durante seis meses. Su análisis espectroscópico se describe a continuación:

Se observa en δ 8,06 a 8,10 ppm un dd correspondiente al H-6, en δ 7,51 a 7,56 ppm un multiplete correspondiente a los H 4 y 5, en δ 7,15 a 7,18 ppm un dd correspondiente al grupo H-3 y en δ 7,0 ppm un singlete correspondiente a los H 1 y 8 del anillo del xanteno

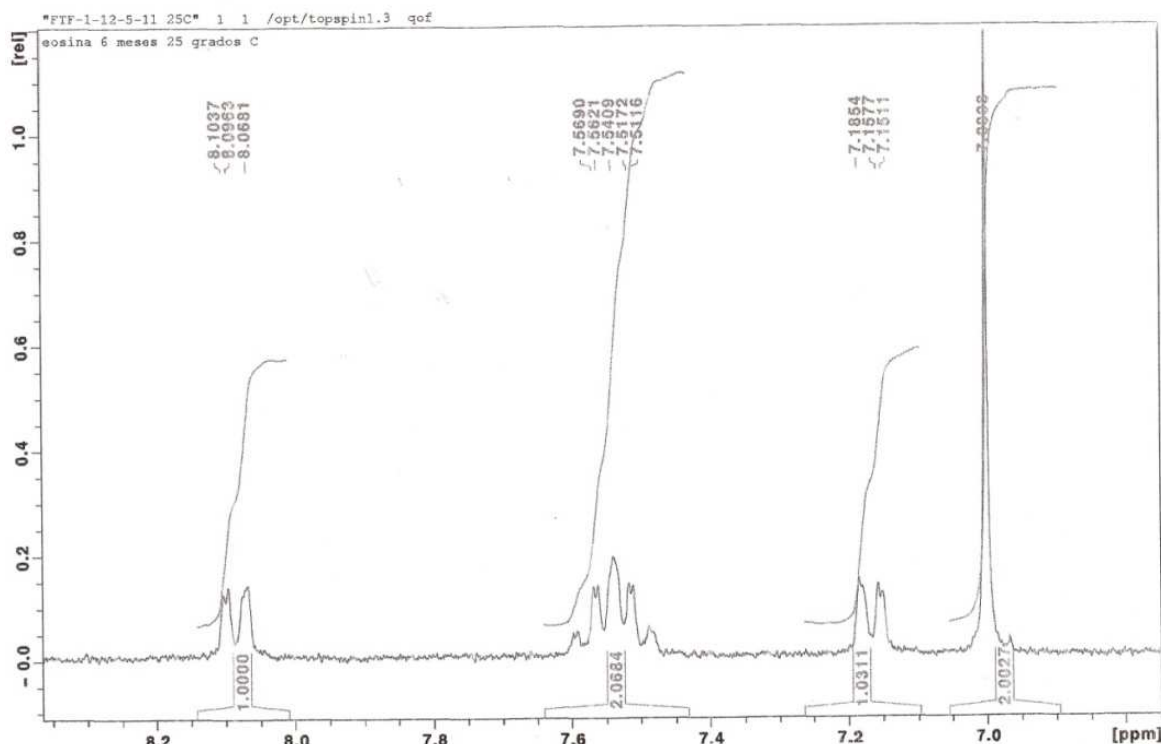


Figura 9: RMN de eosina a los seis meses a 25° C.

Espectros RMN de ^1H para las muestras almacenadas a 40° durante 6 meses.

En la figura 10 se muestra el espectro de ^1H -RMN de la eosina almacenada a 40 ° C durante seis meses. Su análisis espectroscópico se describe a continuación:

Se observa en δ 8,06 a 8,10 ppm un dd correspondiente al H-6, en δ 7,49 a 7,59 ppm un multiplete correspondiente a los H 4 y 5, en δ 7,15 a 7,18 ppm un dd correspondiente al grupo H-3 y en δ 6,99 ppm un singlete correspondiente a los H 1 y 8 del anillo del xanteno

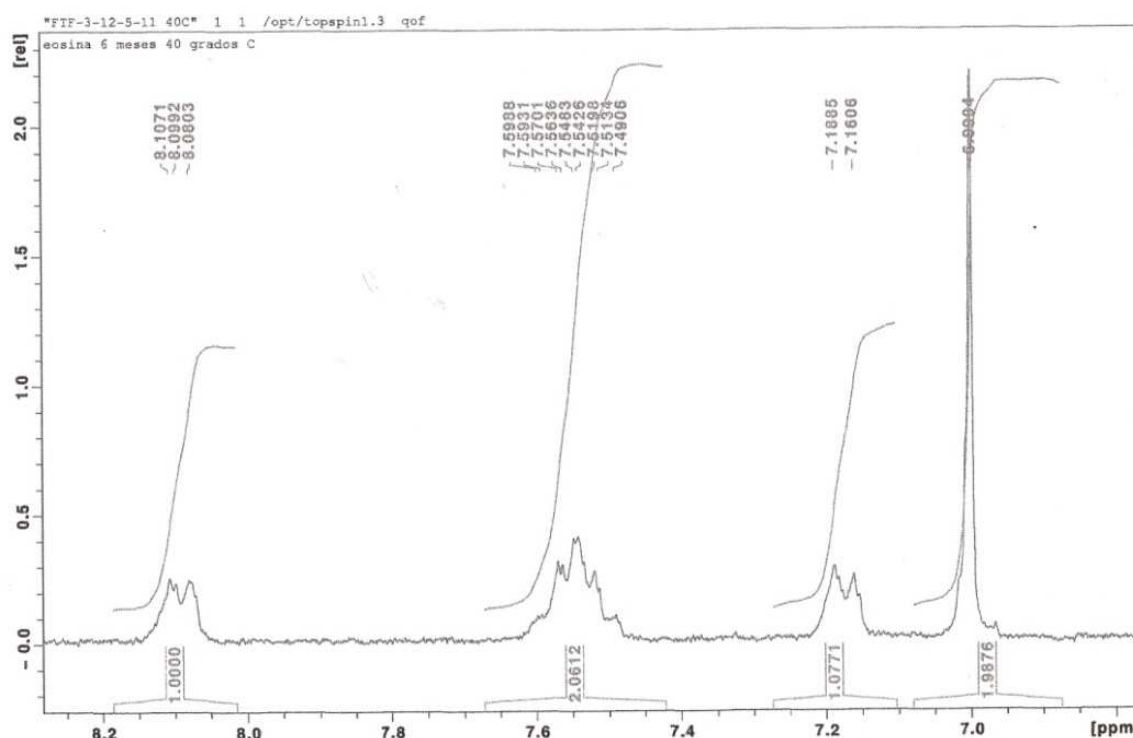


Figura 10: RMN de eosina a los seis meses a 40° C.

A la vista de los resultados no se aprecian diferencias en los desplazamientos de los protones entre las muestra patrón y las almacenadas a 25 y 40 °C en ninguno de los tiempos.

4.7. VALORACIÓN POR INFRARROJOS

Las medidas espectroscópicas por Infrarrojos (IR), se han llevado a cabo en el siguiente instrumento:

- Un equipo FT - Perkin Elmer Paragon 1000 del departamento de Química Orgánica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid (UCM).

A partir de las muestras almacenadas en la estufas de 25° C y 40° C se extrae una parte alícuota en cantidad suficiente, posteriormente se realiza una liofilización para extraer el líquido diluyente y dejar la muestra en polvo de

eosina, una vez obtenido el polvo de eosina, éste se mezcla con bromuro de potasio R finamente pulverizado y seco. Esta mezcla se comprime en una prensa de troquel mecánica para formar una pastilla translúcida que se utiliza para medir en el espectrofotómetro de infrarrojos.

También se preparan muestras a partir de la eosina polvo para obtener una muestra patrón y poder comparar los distintos espectros.

4.8. RESULTADOS DE LA VALORACIÓN POR INFRARROJOS

Los datos obtenidos se muestran a continuación:

A continuación en la figura 11 se muestra el espectro IR de la eosina (2', 4', 5', 7' tetrabromofluoresceína), como pastilla de BrK obtenida de la bibliografía. (70).

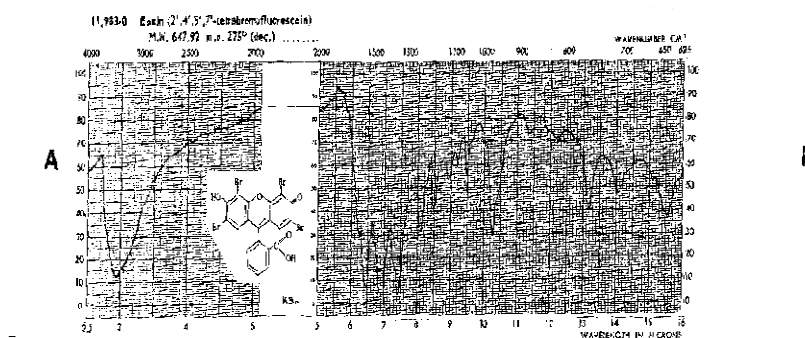


Figura 11: Espectro IR de la eosina.

Espectros IR de eosina a los tres meses de almacenamiento.

A continuación en las figuras 12 y 13 se muestran los espectros IR obtenidos de una muestra de eosina patrón y los obtenidos de una muestra después de tres meses de almacenamiento a 40° C, ambos registrados como pastilla de KBr

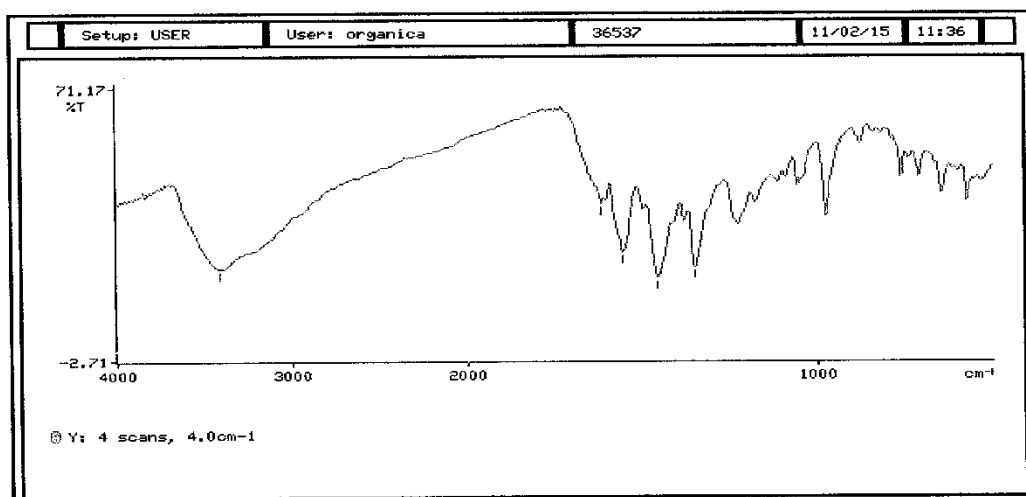


Figura 12: Espectro de eosina patrón.

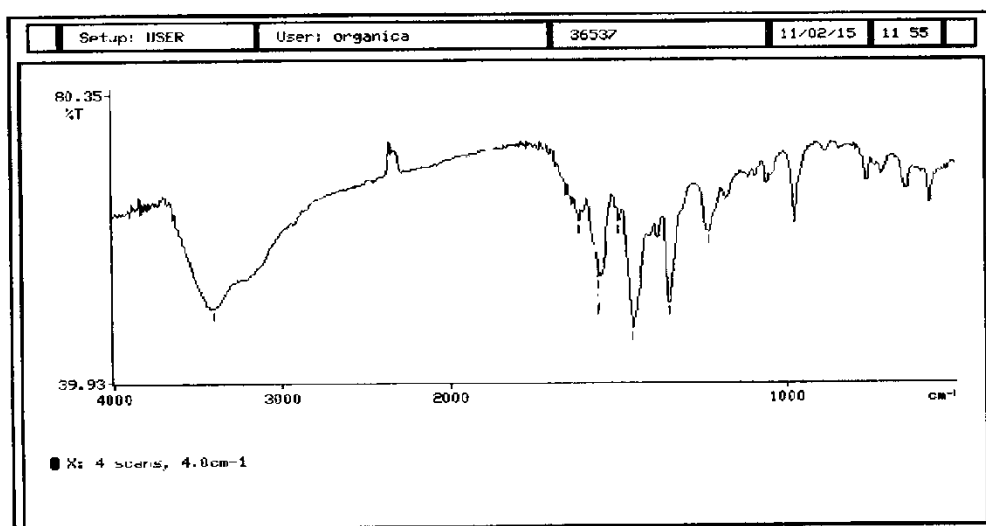


Figura 13: Espectro de eosina almacenada a 40°C durante 3 meses

Para la muestra patrón se observan bandas de absorción a las siguientes longitudes de onda; 3411,1, 1617,7, 1558,1, 1457,8, 1351,4 cm^{-1} ; y para las muestras almacenadas a 40° C 3410,1, 1618,0, 1559,9 cm^{-1} , 1458,1, 1351,0 cm^{-1} .

Espectros IR de eosina a los seis meses de almacenamiento.

A continuación en las figuras 14,15 y 16 se muestran los espectros IR obtenidos de una muestra de eosina patrón y los obtenidos de una muestra después de seis meses de almacenamiento a 25° C y a 40° C.

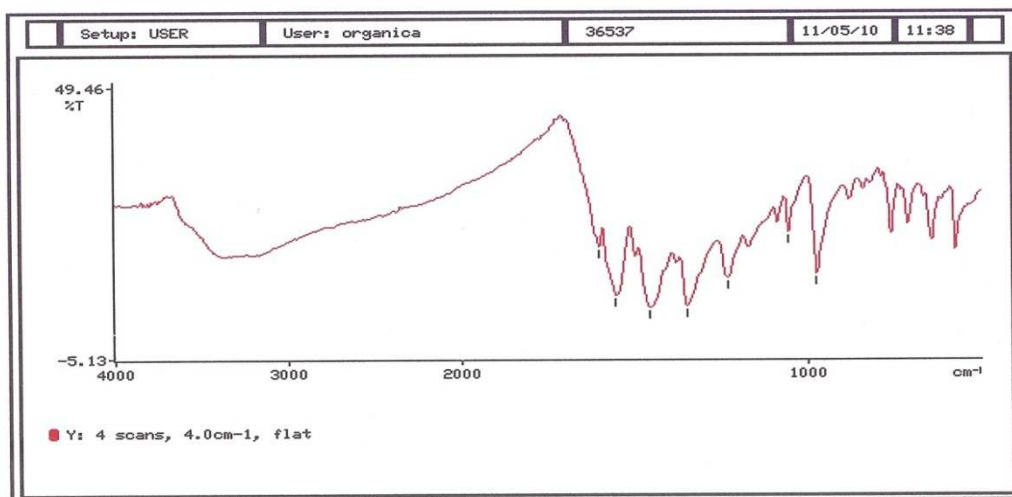


Figura 14: Espectro IR muestra patron a los 6 meses

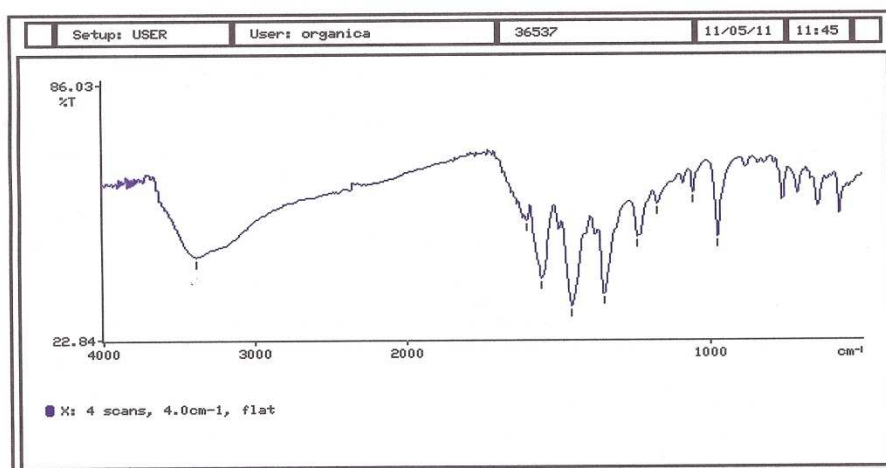


Figura 15: Espectro de eosina almacenada a 25°C durante 6 meses

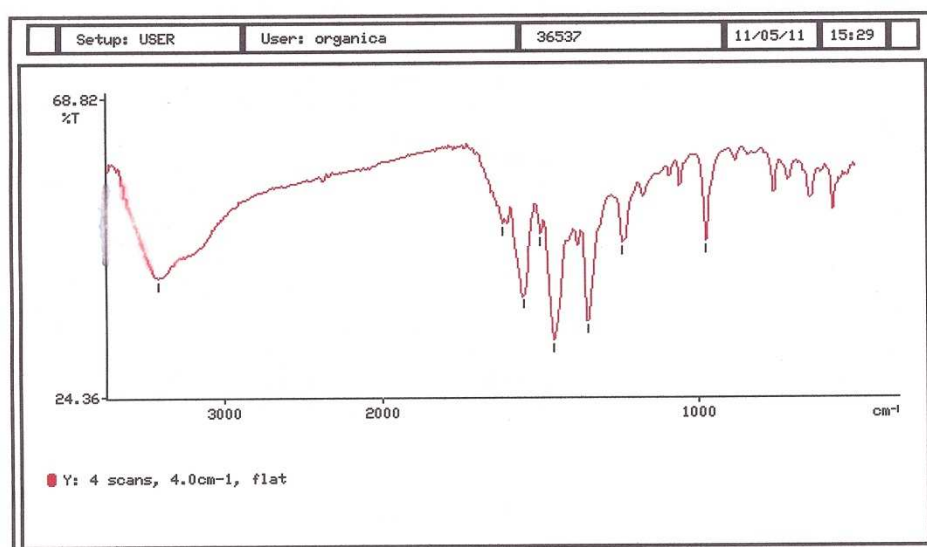


Figura 16: Espectro de eosina almacenada a 40°C durante 6 meses

Para la muestra patrón se observan bandas de absorción a las siguientes longitudes de onda, 3386,4, 1604,3, 1557,1, 1458,0, 1351,4 cm^{-1} para las muestras almacenadas a 25° C 3386,9, 1604,4, 1558,6, 1457,8, 1351,3 cm^{-1} ; y para las muestras almacenadas a 40° C 3411,8, 1617,9, 1554,0, 1457,8, 1351,3 cm^{-1} .

Como puede observarse, la región denominada huella dactilar ($D < 1500 \text{ cm}^{-1}$) muestra coincidencia entre los espectros realizados con las muestras almacenadas a 25 y 40° C y estas a su vez, con los espectros realizados con la muestra patrón y con el espectro recogido en la bibliografía. Por lo que se puede concluir que no hay diferencias entre los espectros y por lo tanto no se han detectado alteraciones que hagan sospechar la existencia de productos de degradación.

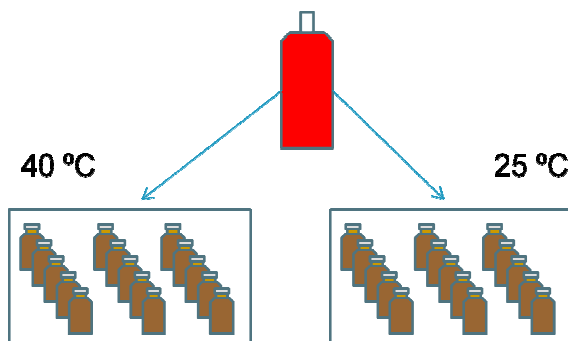
4.9. ESTUDIO DE ESTABILIDAD DE LA EOSINA EN SOLUCIÓN

La eosina está disuelta en agua purificada y se envasa en frasco de vidrio topacio impermeable, por lo que el estudio de estabilidad se realiza en condiciones de humedad ambiental y controlando la temperatura de almacenamiento, que es la variable que puede influir más severamente en la estabilidad del preparado.

Las características de las muestras para el estudio de estabilidad son las siguientes:

Se parte de 1 litro de solución de eosina al 2% y se ponen partes alícuotas en viales de vidrio topacio de 5 ml de capacidad. Se han llenado 15 viales por cada temperatura de almacenamiento.

El esquema final es el siguiente:



Con esta distribución se obtienen 2 grupos de producto para ser almacenados bajo diferentes condiciones.

Un grupo de 15 viales almacenados en estufa a 25 °C, y otro grupo de 15 viales que se almacenan a 40 °C, por lo que del total de 1 litro elaborado, 450 ml se destinan a ser almacenados y el resto se analiza por triplicado en el espectrofotómetro UV a 516,5 nm para determinar la riqueza a tiempo cero de esta solución madre preparada.

También se realiza una gravimetría de todos y cada uno de los viales antes de su almacenamiento en estufa y cada vez que se vayan a analizar los diferentes viales en el ensayo de potencia a cada intervalo de tiempo.

Las determinaciones de potencia se realizan a los intervalos de tiempo siguientes:

0, 3 días, 7 días, 21 días, 3 meses y 6 meses como mínimo.

Los viales preparados a partir del lote original eosina 2 % en solución acuosa, se pesaron previamente con el objeto de controlar a posteriori cualquier desviación significativa en peso que pudiera hacer sospechar una evaporación del disolvente con el consiguiente aumento de la concentración de la solución original.

4.10. RESULTADOS. GRAVIMETRÍAS Y VALORES INICIALES

Los datos obtenidos son los siguientes:

Gravimetrías

En color azul figuran los viales utilizados para determinar la potencia por medio de espectrofotometría a 516,5 nm. En color rojo figuran los viales utilizados para las técnicas de RMN e IR

Tª 25°	g	g	g	g	g	g
muestras	tiempo 0	3 días	7 días	21 días	3 meses	6 meses
1	14,699	14,699				
2	14,777	14,777				
3	14,503	14,503				
4	14,652		14,652			
5	14,900		14,900			
6	14,736		14,736			
7	14,618			14,617		
8	14,402			14,402		
9	14,665			14,665		
10	14,579				14,579	
11	14,373				14,373	
12	14,641				14,640	
13	14,781				14,780	
14	14,816					14,816
15	14,762					14,762

Tabla 85: gravimetrías de viales de vidrio almacenados a 25° C

Tª 40°	G	g	g	g	g	g
muestras	tiempo 0	3 DIAS	7 DIAS	21 DIAS	3 MESES	6 MESES
1	14,759	14,758				
2	14,822	14,821				
3	14,716	14,715				
4	14,391		14,390			
5	14,483		14,482			
6	14,840		14,839			
7	14,788			14,787		
8	14,308			14,308		
9	14,799			14,799		
10	14,791				14,790	
11	14,724				14,721	
12	14,596				14,593	
13	14,780				14,776	
14	14,859					14,855
15	14,604					14,599

Tabla 86: gravimetrías de viales de vidrio almacenados a 40° C

Después de realizar las gravimetrías se realizó una determinación por espectrofotometría, para comprobar la concentración de eosina a tiempo 0.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

fecha 26/11/2010			
datos a 516,5 nm			
muestras eosina	absorbancias	concentración µg/ml	% recuperación
1	0,5563		
1	0,5571		
1	0,5561		
2	0,5579		
2	0,5561		
2	0,5569		
3	0,5589		
3	0,5566		
3	0,5569	4,0791	101,98%
promedio	0,5570		
des est.	0,000863813		
c.v.	0,16%		

Tabla 87: valores de concentración a tiempo 0.

El valor inicial de concentración está dentro de los límites de aceptación (95 – 105)%.

Se determinó la concentración de las muestras en los siguientes intervalos de tiempo: a los 3, 7, 21 días y a los 3 y 6 meses después de haber sido almacenadas en una estufa a 25°C

4.11. ESTABILIDAD A LARGO PLAZO

Antes de cada determinación espectrofotométrica se realizó un barrido desde 190 a 600 nm, para descartar la posible aparición de picos diferentes al barrido inicial y comprobar además que el pico de máxima absorción seguía siendo de 516,5 nm. Después se procedió a la determinación de la concentración tras la valoración espectrofotométrica.

4.12. RESULTADOS A LARGO PLAZO

Valores al cabo de 3 días

Barrido entre 190 y 600 nm de λ .

tª 25 ° c

<i>barrido entre 190 y 600 nm</i>	
λ	absorbancias
516,5	0,530
339	0,031
300	0,111
254	0,220
199,5	0,267

Tabla 88: barrido espectrofotométrico a tiempo = 3 días a 25° C

Valores de concentración

datos a 516,5 nm				
vial 1	absorbancias	promedio	concentración µg/ml	% recuperación
1	0,5690			
2	0,5697			
3	0,5681			
4	0,5626			
5	0,5613	0,5661	4,1485	103,71%
vial 2				
1	0,5629			
2	0,5630			
3	0,5466			
4	0,5480			
5	0,5519	0,5545	4,0602	101,50%
vial 3				
1	0,5457			
2	0,5440			
3	0,5440			
4	0,5440			
5	0,5457	0,5447	3,9859	99,65%
		conc media	4,0649	101,62%
		des est.	0,066474466	
		c.v.	1,64%	

Tabla 89: Valores de concentración al cabo de 3 días a 25° C**Valores al cabo de 7 días**

En este período no se realizó barrido por estar muy próximo al valor anterior. Se midieron las concentraciones a 516,5 nm al igual que la prueba a los tres días.

Valores de concentración

datos a 516,5 nm				
vial 4	absorbancias	promedio	concentración µg/ml	% recuperación
1	0,5587			
2	0,5573			
3	0,5571			
4	0,5576			
5	0,5581	0,5578	4,0850	102,13%
vial 5				
1	0,5837			
2	0,5836			
3	0,5810			
4	0,5830			
5	0,5831	0,5829	4,2754	106,88%
vial 6				
1	0,5869			
2	0,5881			
3	0,5876			
4	0,5867			
5	0,5871	0,5873	4,3087	107,72%
		conc media	4,2230	105,58%
		des est.	0,098540761	
		c.v.	2,33%	

Tabla 90: Valores de concentración al cabo de 7 días a 25° C**Valores al cabo de 21 días**Barrido entre 190 y 600 nm de λ .**tª 25 ° c**

barrido entre 190 y 600 nm	
λ	absorbancias
516,5	0,549
340	0,035
300	0,098
254	0,213
203	0,245

Tabla 91: barrido espectrofotométrico a tiempo = 21 días a 25° C

Valores de concentración

datos a 516,5 nm				
vial 7	absorbancias	promedio	concentración µg/ml	% recuperación
1	0,5493			
2	0,5490			
3	0,5506			
4	0,5504			
5	0,5581	0,5515	4,0374	100,94%
vial 8				
1	0,5630			
2	0,5816			
3	0,5804			
4	0,5836			
5		0,5772	4,2320	105,80%
vial 9				
1	0,5727			
2	0,5754			
3	0,5680			
4	0,5701			
5		0,5716	4,1895	104,74%
		conc media	4,1530	103,82%
		des est.	0,083515893	
		c.v.	2,01%	

Tabla 92: Valores de concentración al cabo de 21 días a 25° C**Valores al cabo de 3 meses**Barrido entre 190 y 600 nm de λ .**tª 25 ° c**

barrido entre 190 y 600 nm	
λ	absorbancias
516,5	0,526
342	0,021
300	0,098
253,5	0,191
202,5	0,195

Tabla 93: barrido espectrofométrico a tiempo = 3 meses a 25° C

Valores de concentración

datos a 516,5 nm				
vial 11	absorbancias	promedio	concentración µg/ml	% recuperación
1	0,5327			
2	0,5303			
3	0,5307			
4	0,5321			
5	0,5321	0,5316	3,8866	97,17%
vial 12				
1	0,5049			
2	0,5043			
3	0,5056			
4	0,5057			
5	0,5041	0,5049	3,6846	92,11%
vial 13				
1	0,5629			
2	0,5633			
3	0,5626			
4	0,5623			
5	0,5639	0,5630	4,1247	103,12%
		conc media	3,8986	97,47%
		des est.	0,179884734	
		c.v.	4,61%	

Tabla 94: Valores de concentración al cabo de 3 meses a 25° C

Valores al cabo de 6 meses

Barrido entre 190 y 600 nm de λ .

tª 25 ° c

barrido entre 190 y 600 nm	
λ	absorbancias
516,5	0,579
301	0,090
254,5	0,208
228,5	0,150
202,5	0,255

Tabla 95: barrido espectrofotométrico a tiempo = 6 meses a 25° C

Valores de concentración

datos a 516,5 nm				
vial 15	absorbancias	promedio	concentración µg/ml	% recuperación
1	0,5720			
2	0,5749			
3	0,5747			
4	0,5747			
5	0,5749	0,5742	4,2099	105,25%
vial 15'				
1	0,5336			
2	0,5337			
3	0,5337			
4	0,5337			
5	0,5337	0,5337	3,9025	97,56%
vial 15"				
1	0,5519			
2	0,5520			
3	0,5544			
4	0,5511			
5	0,5514	0,5522	4,0426	101,06%
		conc media	4,0517	101,29%
		des est.	0,125646237	
		c.v.	3,10%	

Tabla 96: Valores de concentración al cabo de 6 meses a 25° C

En el estudio a largo plazo se ha evaluado la concentración de eosina de las muestras almacenadas a 25 °C a diferentes tiempos.

En todos los intervalos de tiempo medidos se realizó un barrido espectral para detectar la aparición de picos de absorción diferentes al obtenido en el inicio del estudio y que nos alertara de la existencia de que el producto ya no presentaba las mismas características espectrofotométricas. En ningún caso se han obtenido picos de absorción máximos diferentes a 516,5 nm, en ninguno de los intervalos de tiempo analizados. Con respecto a las concentraciones obtenidas en los diferentes intervalos de tiempo se observa que tenemos un valor ligeramente superior a 105% en la prueba realizada a los 7 días. Los valores siguientes han mostrado todos sin embargo valores comprendidos

entre el 95 y el 105%, por lo que pensamos que ha podido ser un valor asociado al error sistemático de trabajo.

4.13. ESTABILIDAD EN CONDICIONES ACELERADAS

Se realizó también un barrido desde 190 a 600 nm para descartar la aparición de un espectro distinto al del barrido inicial y comprobar que el pico de máxima absorción sigue siendo 516,5 nm.

4.14. RESULTADOS EN CONDICIONES ACELERADAS

Valores al cabo de 3 días

Barrido entre 190 y 600 nm de λ .

t^a 40 ° c

<i>barrido entre 190 y 600 nm</i>	
λ	absorbancias
516,5	0,558
339	0,032
301	0,11
253	0,219
200	0,265

Tabla 97: barrido espectrofotométrico a tiempo = 3 días a 40° C

Valores de concentración

datos a 516,5 nm				
vial 1	absorbancias	promedio	concentración µg/ml	% recuperación
1	0,5359			
2	0,5350			
3	0,5344			
4	0,5343			
5	0,5336	0,5346	3,9098	97,75%
vial 2				
1	0,5625			
2	0,5630			
3	0,5657			
4	0,5466			
5	0,5496	0,5575	4,0829	102,07%
vial 3				
1	0,5479			
2	0,5469			
3	0,5470			
4	0,5470			
5	0,5469	0,5471	4,0045	100,11%
		conc media	3,9991	99,98%
		des est.	0,070765987	
		c.v.	1,77%	

Tabla 98: Valores de concentración al cabo de 3 días a 40° C

Valores al cabo de 7 días

En este período no se realizó barrido por estar muy próximo al valor anterior. Se midieron las concentraciones a 516,5 nm al igual que la prueba a los tres días.

Valores de concentración

datos a 516,5 nm				
vial 4	absorbancias	promedio	concentración µg/ml	% recuperación
1	0,5584			
2	0,5594			
3	0,5593			
4	0,5594			
5	0,5589	0,5591	4,0950	102,38%
vial 5				
1	0,5507			
2	0,5511			
3	0,5530			
4	0,5514			
5	0,5517	0,5516	4,0382	100,95%
vial 6				
1	0,5860			
2	0,5861			
3	0,5864			
4	0,5883			
5	0,5879	0,5869	4,3061	107,65%
		conc media	4,1464	103,66%
		des est.	0,115280531	
		c.v.	2,78%	

Tabla 99: Valores de concentración al cabo de 7 días a 40° C**Valores al cabo de 21 días**Barrido entre 190 y 600 nm de λ .**tª 40 ° c**

barrido entre 190 y 600 nm	
λ	absorbancias
516,5	0,552
300,5	0,093
253	0,212
238	0,184
211	0,37

Tabla100: barrido espectrofométrico a tiempo = 21 días a 40° C

Valores de concentración

datos a 516,5 nm				
vial 7	absorbancias	promedio	concentración µg/ml	% recuperación
1	0,5361			
2	0,5671			
3	0,5690			
4	0,5697			
5		0,5605	4,1056	102,64%
vial 8				
1	0,5500			
2	0,5517			
3	0,5516			
4	0,5539			
5		0,5518	4,0398	101,00%
vial 9				
1	0,5694			
2	0,5526			
3	0,5507			
4	0,5690			
5		0,5604	4,1052	102,63%
		conc media	4,0835	102,09%
		des est.	0,030901032	
		c.v.	0,76%	

Tabla 101: Valores de concentración al cabo de 21 días a 40° C**Valores al cabo de 3 meses**Barrido entre 190 y 600 nm de λ .**tª 40 ° c**

barrido entre 190 y 600 nm	
λ	Absorbancias
516,5	0,576
341	0,042
300	0,098
253,5	0,213
202	0,253

Tabla 102: barrido espectrofotométrico a tiempo = 3 meses a 40° C

Valores de concentración

datos a 516,5 nm				
vial 11	absorbancias	promedio	concentración µg/ml	% recuperación
1	0,5667			
2	0,5696			
3	0,5713			
4	0,5724			
5	0,5737	0,5707	4,1834	104,58%
vial 12				
1	0,5567			
2	0,5596			
3	0,5619			
4	0,5614			
5	0,5611	0,5601	4,1031	102,58%
vial 13				
1	0,5576			
2	0,5697			
3	0,5723			
4	0,5759			
5	0,5767	0,5704	4,1811	104,53%
		conc media	4,1558	103,90%
		des est.	0,037342373	
		c.v.	0,90%	

Tabla 103: Valores de concentración al cabo de 3 meses a 40° C**Valores al cabo de 6 meses**

Barrido entre 190 y 600 nm de λ .

tª 40 ° c

barrido entre 190 y 600 nm	
λ	absorbancias
516,5	0,554
315,5	0,052
300,5	0,098
253	0,211
202,5	0,262

Tabla 104: barrido espectrofométrico a tiempo = 6 meses a 40° C

Valores de concentración

datos a 516,5 nm				
vial 15	absorbancias	promedio	concentración µg/ml	% recuperación
1	0,5400			
2	0,5417			
3	0,5409			
4	0,5463			
5	0,5451	0,5428	3,9716	99,29%
vial 15'				
1	0,5559			
2	0,5550			
3	0,5556			
4	0,5550			
5	0,5551	0,5553	4,0665	101,66%
vial 15"				
1	0,5310			
2	0,5316			
3	0,5316			
4	0,5309			
5	0,5306	0,5311	3,8833	97,08%
		conc media	3,9738	99,35%
		des est.	0,074822102	
		c.v.	1,88%	

Tabla 105: Valores de concentración al cabo de 6 meses a 40° C

En el estudio en condiciones aceleradas se ha evaluado la concentración de eosina de las muestras almacenadas a 40 °C a diferentes tiempos.

De la misma manera que en el estudio a largo plazo se realizó un barrido espectral en todos los plazos de medición para detectar la aparición de picos de absorción diferentes al obtenido en el inicio del estudio. En ningún caso se han obtenido picos de absorción máximos diferentes a 516,5 nm, en ninguno de los intervalos de tiempo analizados. Con respecto a las concentraciones obtenidas en los diferentes intervalos de tiempo se observa que todos los valores están comprendidos entre el 95 y el 105%, con coeficientes de variación también inferiores al 5% en todos los casos. Se puede concluir por ahora que las muestras de eosina permanecen estables a diferentes temperaturas. Más adelante se realizará un análisis estadístico.

4.15. ESTUDIO MICROBIOLÓGICO

Al igual que en los dos estudios anteriores de minoxidil y sulfato de cobre y por las mismas razones, se considera necesario realizar un estudio microbiológico y determinar el recuento de microorganismos aerobios viables totales en las muestras, siguiendo el método de la RFE (49) y realizar un recuento de bacterias aerobias viables y de hongos (50).

Se utiliza también el método de filtración. En nuestro caso partimos de una solución de eosina al 2%.

Técnica:

Se parte de 3 muestras de solución de eosina al 2% de 250 ml cada una, envasadas en envase de vidrio topacio. Seguidamente se realizan dos tomas de muestra de cada envase, una de 1 ml que se diluye hasta 10 ml con el diluyente (solución de peptona y cloruro sódico) y otra de 10 ml de solución de sulfato de cobre para cada uno de los medios de cultivo que serán:

- Agar caseína-soja o Agar Triptófano-soja (para recuento de bacterias viables)
- Agar glucosa de Sabouraud (para recuento de mohos y levaduras)

Cada dilución se añade sobre el filtro colocado en el equipo de filtración.

El resto de la técnica es igual que la ya descrita en los estudios anteriores, incubándose a 30 – 35 °C durante 48 – 72 horas para las bacterias y a 20 – 25 °C durante 5 días para los hongos.

Después de incubar se cuenta el número de UFC (unidades formadoras de colonias)/ml obtenidas.

4.16. RESULTADOS ESTUDIO MICROBIOLÓGICO.

1. Solución Eosina al 2% en agua purificada sin tindalizar.

Las soluciones de eosina al 2 % preparadas según se describe en el Formulario Nacional (12), envasadas en frascos de vidrio topacio y conservadas a las temperaturas establecidas por la RFE, presentaron crecimiento microbiano significativo, según se describe en las tablas 106 y 107.

Muestra. Cultivo en	Tiempo 0
Agar Triptófano-Soja	
Muestra 1 Eosina 10 ml	>100 ufc bacterias
Muestra 2 Eosina 10 ml	> 100 ufc bacterias
Muestra 3 Eosina 10 ml	> 100 ufc bacterias
Control medio	0 ufc bacterias
Control diluyente	0 ufc bacterias

Tabla 106: UFC/ml a tiempo 0 en Agar Triptófano Soja.

Muestra. Cultivo en	Tiempo 0
Agar Sabouraud	
Muestra 1 Eosina 10 ml	> 100 ufc hongos
Muestra 2 Eosina 10 ml	> 100 ufc hongos
Muestra 3 Eosina 10 ml	> 100 ufc hongos
Control medio	0 ufc hongos
Control diluyente	0 ufc hongos

Tabla 107: UFC/ml a tiempo 0 en Sabouraud.

Imágenes Cultivos sin tindalizar:

A título de ejemplo se muestran las fotografías de dos muestras diferentes.

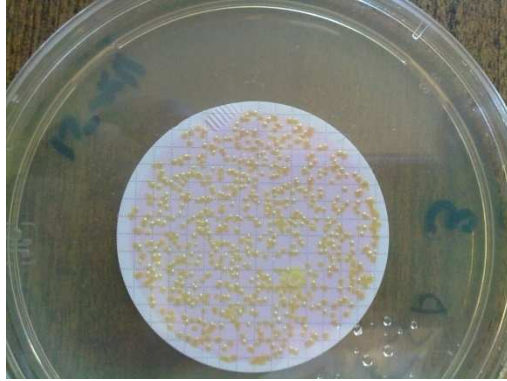


Foto 16: Muestra 3, crecimiento bacteriano > 100 ufc.



Foto 17: Muestra 1, crecimiento de hongos > 100 ufc

Dado el crecimiento obtenido en las soluciones preparadas con agua purificada sin tindalizar se procedió a la elaboración de las muestras con agua purificada y previamente tindalizada.

2. Solución Eosina al 2% en agua purificada tindalizada

Dado que en los estudios anteriores las muestras diluidas 1/10 ml no mostraron ningún crecimiento microbiológico significativo, en el estudio de eosina se procedió directamente a cultivar sólo las muestras sin diluir de 10 ml. Sólo en el caso de que se hubiera presentado un crecimiento importante

superior a 100 ufc en este tipo de muestras se hubiera procedido a cultivar las muestras diluidas.

Los valores obtenidos se exponen a continuación según se describe en las tablas 108 y 109.

Medio cultivo bacterias (*Agar – Triptófano Soja*)

Muestra	Tiempo 0	1 mes	3 meses	6 meses
Nº1 (10 ml)	3 ufc	7 ufc	muestra contaminada	22 ufc
Nº2 (10 ml)	0 ufc	0 ufc	1 ufc	9 ufc
Nº3 (10 ml)	0 ufc	0 ufc	muestra contaminada	23 ufc
Control Medio	0 ufc	0 ufc	0 ufc	0 ufc
Control Diluyente	0 ufc	0 ufc	1 ufc	0 ufc

Tabla 108: ufc/ml tras el período de incubación. Medio de cultivo para bacterias.

Los resultados del cultivo en Agar –Triptófano muestran cierto crecimiento en las muestras 1 y 3 a tiempo 0, presentando sólo 1 ufc en ambas muestras. En la muestra 1 después de 1 mes de incubación se observó el crecimiento de 7 ufc de hongos del género *Penicillium* que aunque es un medio propicio para el crecimiento de bacterias también puede darse el crecimiento de hongos. Al cabo de tres meses de incubación se produjo una contaminación en las muestras 1 y 3 por fallos en la manipulación. Sin embargo en la muestra 2 sólo creció 1 ufc. En el ensayo final a los seis meses de incubación aparecieron 22 ufc de hongos en la muestra 1 del género

Aspergillus y 4 ufc de bacterias, en la muestra 2 crecieron 9 ufc de hongos también del género Aspergillus y 23 ufc de hongos en la muestra 3.

En cualquier caso no se superó el número de 100 ufc.

En el caso de los hongos se procedió de igual manera con las diluciones, es decir sólo se cultivaron a partir de tiempo 1 mes las muestras de 10 ml sin diluir.

Medio cultivo hongos (*Agar Sabouraud*)

Muestra	Tiempo 0	1 mes	3 meses	6 meses
Nº1 (10 ml)	0 ufc	7 ufc	0 ufc	0 ufc
Nº2 (10 ml)	1 ufc	0 ufc	1 ufc	3 ufc
Nº3 (10 ml)	1 ufc	0 ufc	0 ufc	17 ufc
Control Medio	0 ufc	0 ufc	0 ufc	0 ufc
Control Diluyente	0 ufc	0 ufc	0 ufc	0 ufc

Tabla 109: ufc/ml tras el período de incubación. Medio de cultivo para hongos.

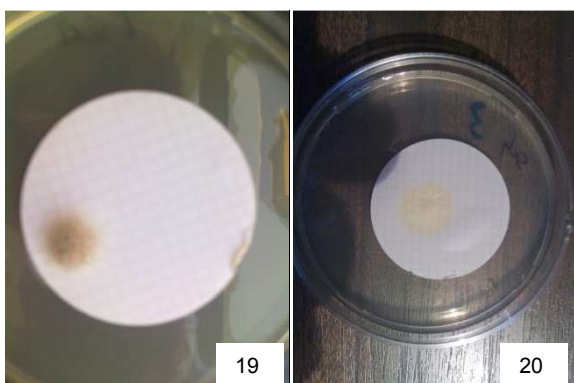
Los resultados obtenidos en los cultivos en Agar Sabouraud muestran un crecimiento de 1 ufc en las muestras 2 y 3 a tiempo 0 del género Aspergillus, 7 ufc en la muestra 1 tras un mes de incubación (6 del género Penicillium y 1 del género Aspergillus), 1 ufc en la muestra 2 a los tres meses y finalmente al cabo de los seis meses se observó el crecimiento de 3 ufc en la muestra 2 y 17 ufc en la muestra 3. Tampoco en este caso se han presentado crecimientos significativos que superen la cantidad de 100 ufc.

A continuación se muestran las imágenes de los cultivos obtenidos más relevantes.

Cultivos a tiempo = 0



Foto 18: Muestra 1 en Agar TS 10 ml se observan 3 ufc



Fotos 19 y 20: muestras 2 y 3 en Agar Sabouraud. Ambas con 1 ufc de aspergillus.

Cultivos a 1 mes



Fotos 21: muestras 1 cultivada en Agar Triptófano Soja a tiempo = 1 mes. Se observan 7 ufc del género *Penicillium*.



Foto 22: muestra 1 en Agar Sabouraud a tiempo = 1 mes. Se observan 7 ufc. 6 del género *Penicillium* y 1 del *Aspergillus*.

Cultivos a 3 meses



Foto 23: Controles medio y diluyente en Agar Triptófano Soja a tiempo = 3 meses. 1 ufc en control diluyente.



Foto 24: Muestras 1 y 3 en Agar TS. Muestras contaminadas durante la elaboración del cultivo. Tiempo = 3 meses



Foto 25: Muestra 2 en Agar TS. Se observa 1 ufc de bacterias. Tiempo = 3 meses



Fotos 26: muestra 2 cultivada en Agar Sabouraud a tiempo = 3 meses. Se observan sólo 1 ufc.

Cultivos a 6 meses



Foto 27: muestra 1 en Agar TS. Se observan 22 ufc de hongos (gen *Aspergillus*) y 4 ufc de bacterias.

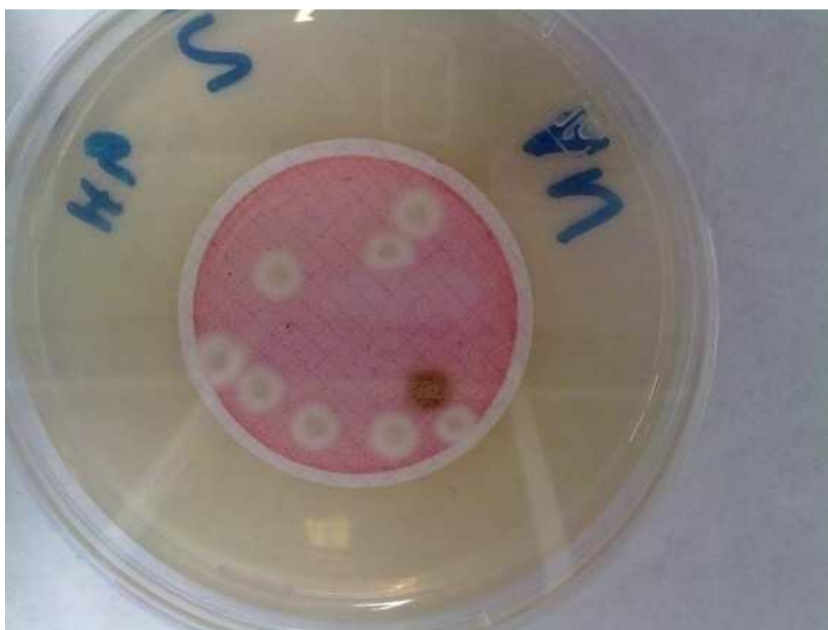


Foto 28: muestra 2 en Agar TS. Se observan 9 ufc de hongos (gen *Aspergillus*) y sin crecimiento de bacterias.

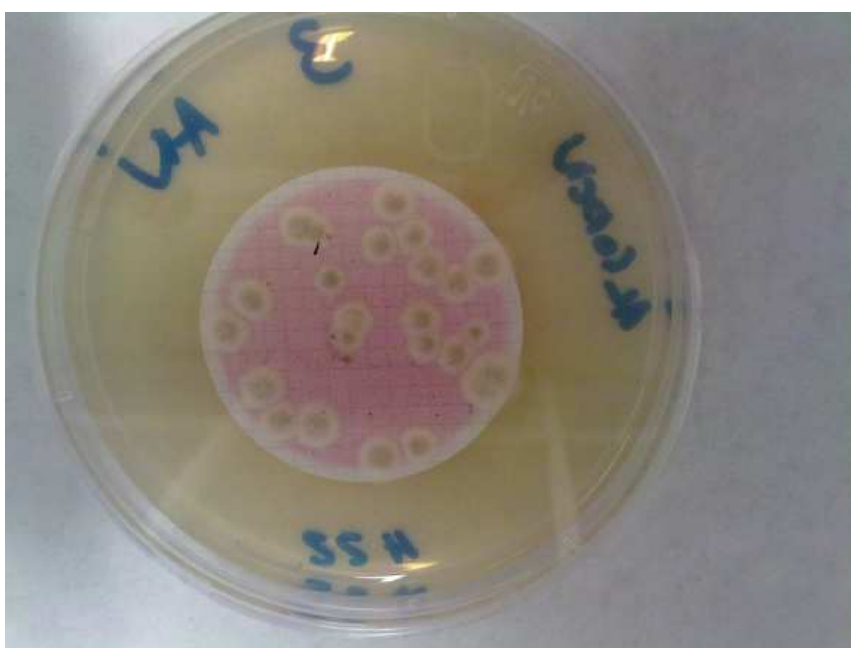


Foto 29: muestra 2 en Agar TS. Se observan 23 ufc de hongos y sin crecimiento de bacterias.



Foto 30: muestra 2 en Agar Sabouraud. Se observan 3 ufc.



Foto 31: muestra 3 en Agar Sabouraud. Se observan 17 ufc.

DISCUSIÓN

Al igual que en el análisis del minoxidil y sulfato de cobre se sigue la normativa del ICH, CPMP/QWP/122/02, donde se marcan los valores límites generales del 95 al 105%, como valores límite aceptables de potencia.

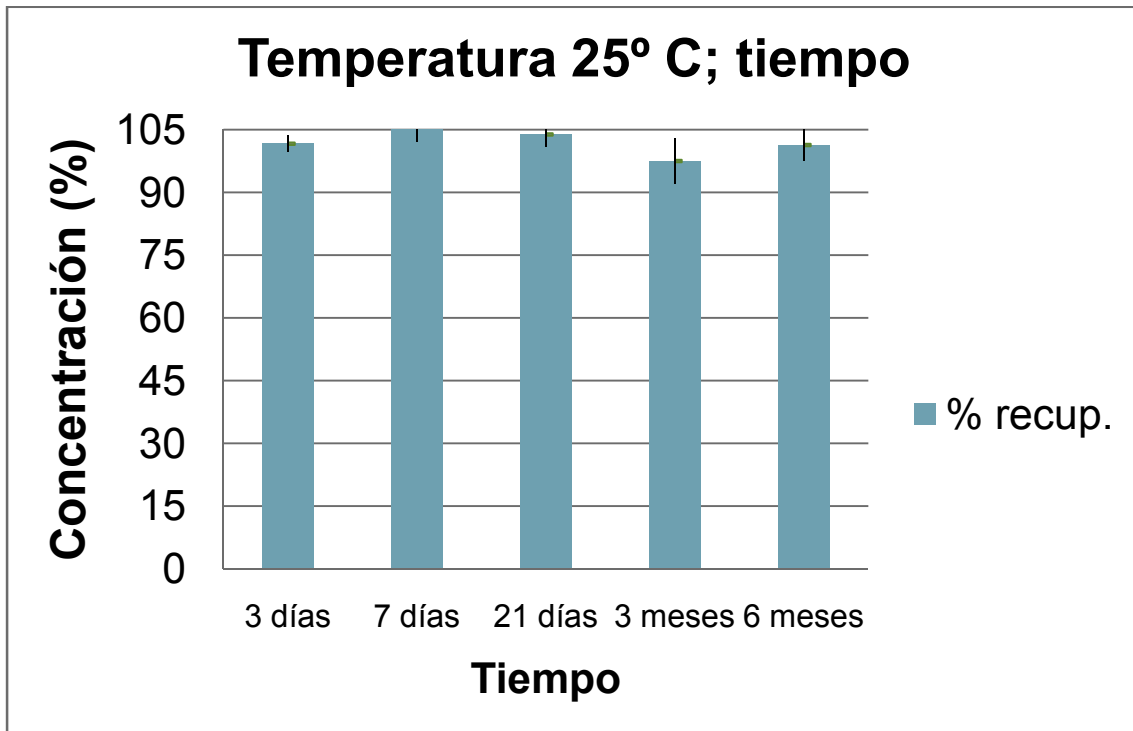
Durante los 6 meses que ha durado el estudio no hemos encontrado valores de potencia que estén fuera de estos límites de aceptación. En la tabla 110 se muestran los valores del porcentaje de recuperación obtenidos a tiempo 0, 3, 7 y 21 días y al mes, a los 3 meses y a los 6 meses después de la elaboración del lote del producto preparado, solución acuosa de eosina al 2%.

Los valores del porcentaje de recuperación se obtuvieron según la recta de regresión previamente calculada y validada como método fiable de determinación.

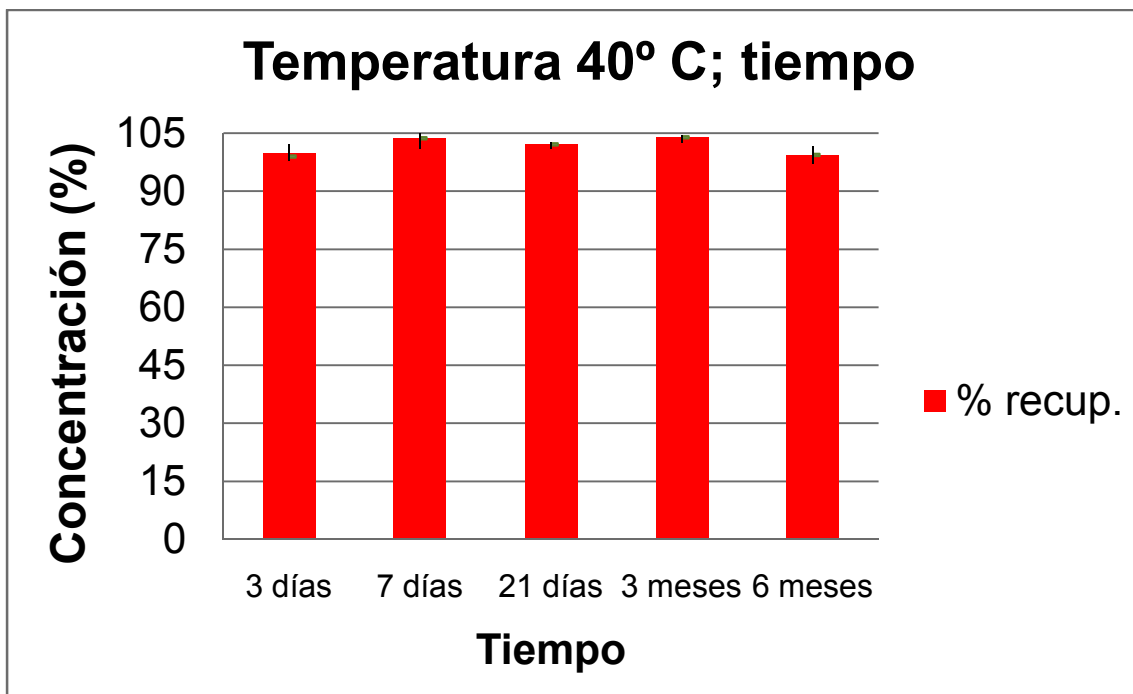
% de recuperación	tiempo 0	3 días		7 días		21 días		3 meses		6 meses	
		25 °C	40 °C	25 °C	40 °C	25 °C	40 °C	25 °C	40 °C	25 °C	40 °C
	101,98%	101,62%	99,98%	105,58%	103,66%	103,82%	102,09%	97,47	103,90%	101,29%	99,35%
C.V.	0,16%	1,64%	1,77%	2,33%	2,78%	2,01%	0,76%	4,61	0,90%	3,10%	1,88%

Tabla 110: porcentajes de concentración a lo largo del estudio y valores del coeficiente de variación (C.V.)

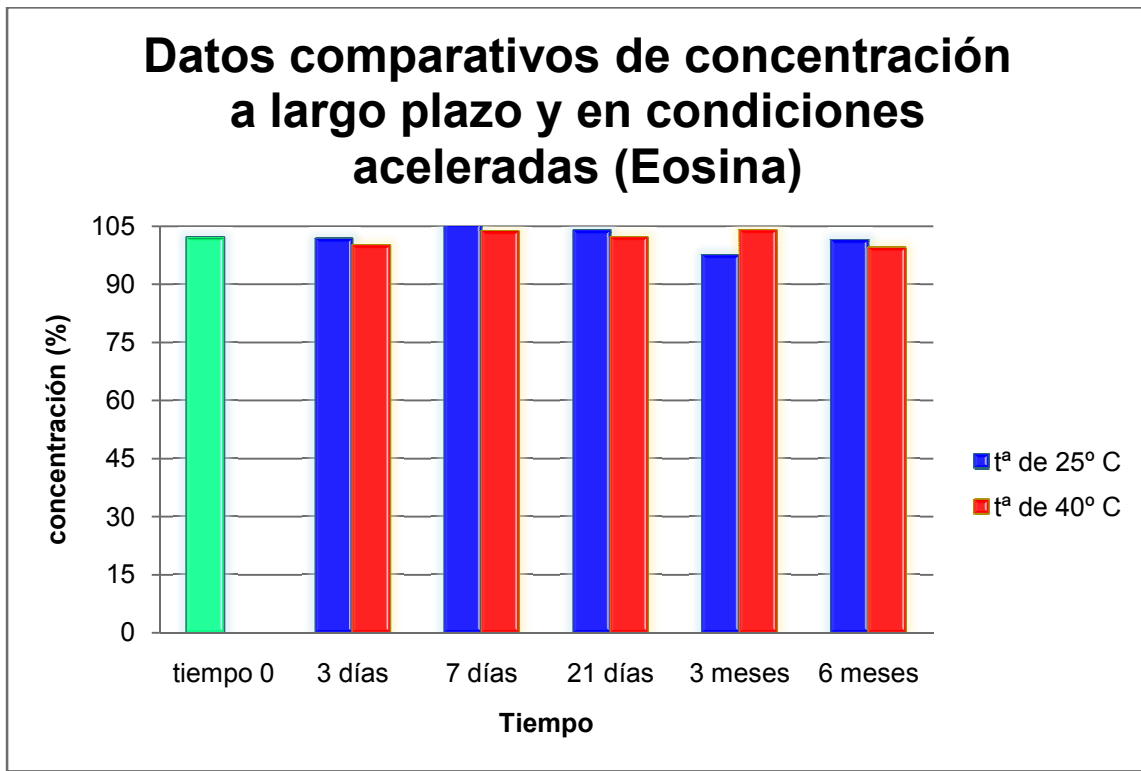
A continuación se muestran las gráficas de porcentajes de recuperación en concentración según temperatura de almacenamiento y evolución en el tiempo. Como podemos comprobar los datos de concentración están dentro de los límites de riqueza aceptables de $\pm 5\%$, según criterio general actual de la Unión Europea, exceptuando el valor promedio a los siete días para los viales almacenados a 25° C. Por otro lado es un valor que sobrepasa muy ligeramente el 5% de desviación, por lo que no se le ha dado mayor importancia, en todo caso se podría pensar en un aumento de la concentración por evaporación del disolvente. Además el coeficiente de variación es también inferior al 5%, lo que nos ofrece mayor fiabilidad de los datos obtenidos. Esto es así tanto para los frascos almacenados a largo plazo a 25° C de temperatura como para los almacenados en condiciones aceleradas a 40° C.



Gráfica 32: Valores de concentración de eosina de los viales almacenados a 25° C durante los intervalos de tiempo marcados.



Gráfica 33: Valores de concentración de eosina de los viales a 40° C durante los intervalos de tiempo marcados.



Gráfica 34: Datos comparativos de los valores de concentración de eosina a 25 y 40°C

Al igual que en los estudios anteriores aunque los valores de riqueza no han superado el intervalo del $\pm 5\%$ se ha realizado un estudio estadístico comparativo para saber si se mantiene la hipótesis nula, es decir los valores a diferentes temperaturas no muestran diferencias estadísticamente significativas.

Para ello recurrimos a un estudio de comparación de varias muestras:

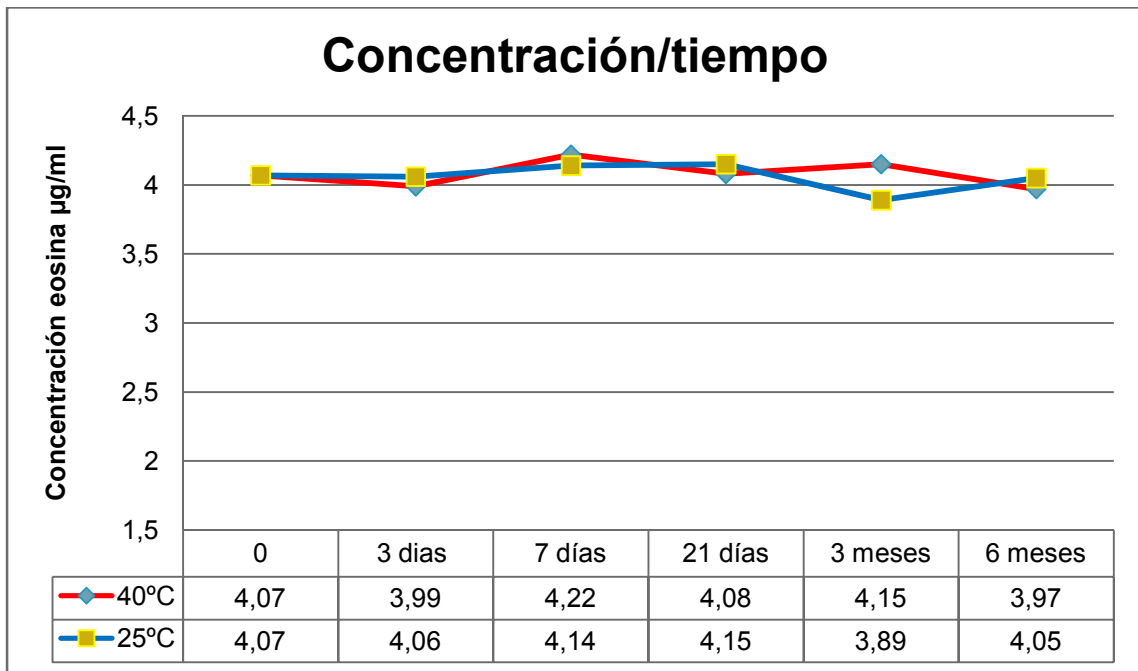
Resumen del Procedimiento.

Muestra 1: 40°C

Muestra 2: 25°C

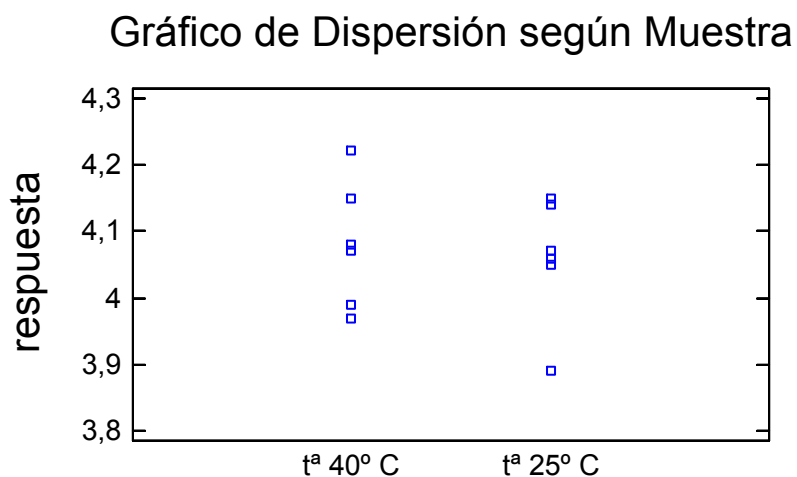
Muestra 1: 6 valores 3,97 hasta 4,22

Muestra 2: 6 valores 3,89 hasta 4,15



Gráfica 35: Valores de concentración a lo largo del tiempo de los frascos almacenados a diferentes temperaturas.

Este procedimiento compara los datos en 2 columnas de los valores de concentración a temperatura de 25 °C con los valores de concentración a temperatura de 40 °C según se ha expuesto en el resumen del procedimiento y los datos que aparecen en la gráfica 36, realizando varios test estadísticos y gráficos para comparar las muestras. El F-test en la tabla de ANOVA comprobará si hay alguna diferencia significativa entre las medias.

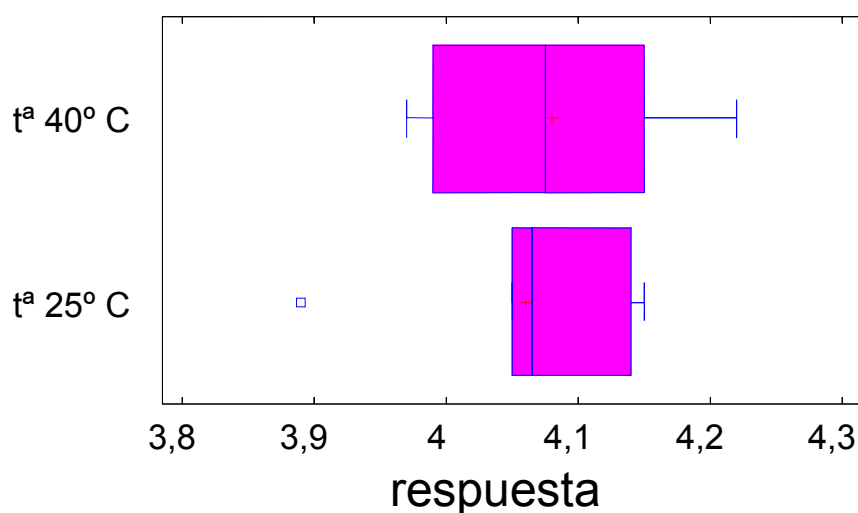


Gráfica 36: dispersión de las muestras 1 y 2.

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente-F	p-Valor
Entre grupos	0,0012	1	0,0012	0,14	0,7202
Intra grupos	0,0884	10	0,00884		
Total (Corr.)	0,0896	11			

Tabla 111: Análisis de la varianza

La tabla 111 descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro de cada grupo. El F-ratio, que en este caso es igual a 0,14 es el cociente de la estimación entre grupos y la estimación dentro de los grupos. Puesto que el p-valor del test F es superior o igual a 0,05, no hay diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 2 variables a un 95%.



Gráfica 37: Gráfica de cajas y bigotes de los datos

	Frecuencia	Media	Error estándar	Límite inferior	Límite superior
Tª 40°C	6	4,08	0,038384	4,0195	4,1405
Tª 25°C	6	4,06	0,038384	3,9995	4,1205
Total	12	4,07			

Tabla 112: medias con 95 intervalos LSD (menores diferencias significativas)

Esta tabla 112 muestra la media para cada columna de datos. También muestra el error estándar de cada media, que es la medida de su variabilidad en la muestra. El error estándar es el resultado de dividir la desviación típica agrupada por la raíz cuadrada del número de observaciones en cada nivel. La tabla también muestra un intervalo que incluye cada media. Los intervalos mostrados actualmente se basan en el procedimiento de las menores diferencias significativas de Fisher (LSD), (ver gráfica 38). Se construyen de tal manera que si dos medias son iguales, sus intervalos se solaparán el 95% de las veces.

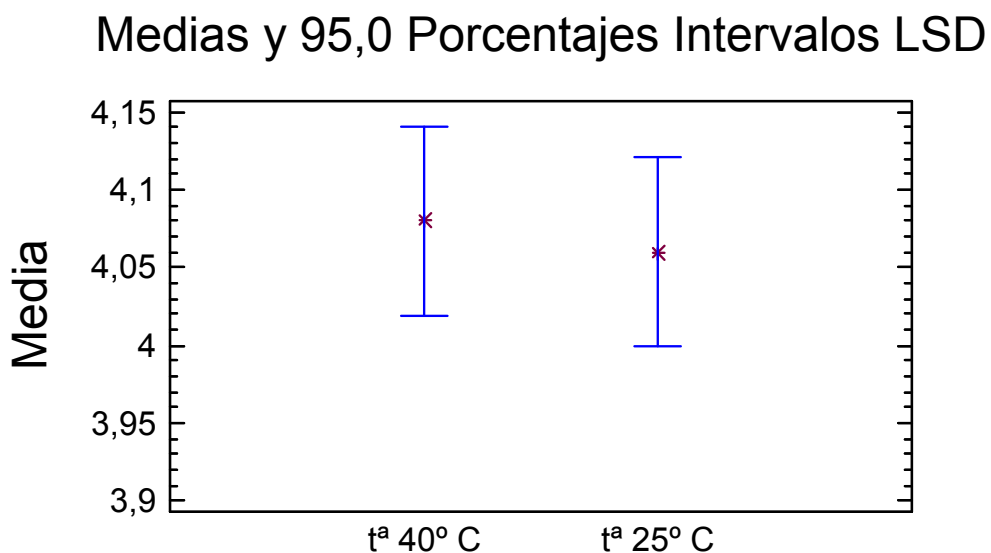


Gráfico 38: menores diferencias significativas

Por último se realizó también el test de Kruskal-Wallis que prueba la hipótesis nula de igualdad de las medianas dentro de cada una de las 2 columnas. Los datos de todas las columnas primero se combinan y se ordenan de menor a mayor.

Entonces se calcula el rango medio para los datos en cada columna. Puesto que el p-valor es superior o igual a 0,05, no hay diferencia estadísticamente significativa entre las medianas a un nivel de confianza del 95%.

	Tamaño muestral	Rango medio
T ^a 40°C	6	7,0
T ^a 25°C	6	6,0

Estadístico = 0,2324 P-valor = 0,6297

Tabla 113: Test de Kruskal-Wallis

Por lo tanto no se observan diferencias estadísticamente significativas entre los viales almacenados a largo plazo ($25^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$) y los almacenados en condiciones aceleradas ($40^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$) en cuanto a potencia.

Estudio microbiológico:

Las soluciones de eosina preparadas con agua purificada si presentaron un crecimiento significativo de bacterias y hongos.

Las soluciones de eosina preparadas con agua purificada y tinalizada previa a la disolución de la eosina a las proporciones que marca el Formulario Nacional y envasadas en frascos de plástico valona y almacenadas a 30 – 35 °C durante 48 – 72 horas para las bacterias y a 20 – 25 °C durante 5 días para los hongos, no presentan crecimiento bacteriano ni de hongos significativo en ninguno de los intervalos de tiempo evaluados.

CONCLUSIONES FINALES

1ª Se han realizado estudios de estabilidad a temperatura ambiente, en condiciones intermedias y en condiciones aceleradas, así como estudios microbiológicos del preparado oficial solución de minoxidil al 2 %, llegándose a la conclusión de que durante el tiempo ensayado (12 meses) no ha habido pérdida significativa de potencia ni tampoco crecimiento significativo de hongos ni bacterias.

2ª De los estudios de estabilidad y microbiológicos realizados en el preparado oficial solución al 0,1% de sulfato de cobre, se ha llegado a la conclusión de que durante el tiempo ensayado (6 meses) no ha habido pérdida significativa de potencia ni crecimiento significativo de hongos ni bacterias.

3ª Al realizar el estudio de la conservación del preparado oficial solución al 0,1% de sulfato de cobre en diferentes tipos de envases se ha llegado a la conclusión de que el tipo de envase puede tener influencia en la conservación del producto, resultando ser el envase de plástico el más adecuado.

4ª De los estudios de estabilidad llevados a cabo en el preparado oficial solución acuosa de eosina al 2% se puede concluir que en los 6 meses que duró el ensayo no hubo pérdida significativa de potencia.

5ª Tras la realización de los estudios microbiológicos en la solución acuosa de eosina al 2% se ha podido objetivar crecimiento significativo de bacterias y hongos cuando para la elaboración de la solución se utiliza agua calidad farmacopea, por lo que se propone la utilización de agua tindalizada al haber comprobado que de esta manera se evita la proliferación de microorganismos.

6ª Finalmente y según todo lo anteriormente expuesto se puede concluir que el periodo de validez real de los tres preparados oficiales ensayados es muy superior al indicado en el Formulario Nacional. Este resultado es de gran relevancia para los farmacéuticos formuladores de preparados oficiales debido a que genera mayor confianza en cuanto al almacenamiento de estos productos en la estantería de las farmacias.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ley 29/2006, de 26 de Julio, de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios.
2. Escribano MJ. Tesis Doctoral. Estabilidad de fórmulas magistrales de metadona y captopril. Madrid, 2004.
3. Burnett J, Balkin ER. "Stability and viscosity of a flavored omeprazole oral suspension for pediatric use". Am J Health – Syst Pharm- Vol 63 Nov 15, 2006.
4. Morales ME, Gallardo V, López G, Atienza M, Marín R, Ruiz MA. Estabilidad de una formulación oral líquida de morfina para pediatría. Farm Hosp 2006; 30: 29-32.
5. Jover Botella A, Marquez Peiró JF, González Loreiro MD, Pitaluga Poveda L, Selva Otaolaurruchi J. Análisis de la estabilidad de dos suspensiones orales de carbamazepina. Farm Hosp 2011; 35(1): 28-31.
6. Servicio de desarrollo de medicamentos. Estabilidad suspensión oral Tacrolimus a tiempo 12 meses. Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona. Nº de informe: IPAE_09/55_02_01. Enero 2011.
7. Comisión de Formulación del Colegio Oficial de Farmacéuticos de Valencia. Guía de Calidad en Formulación Magistral. Muy Ilustre Colegio Oficial de Farmacéuticos de Valencia. Valencia. 2003.
8. Puerto R. Tesis Doctoral. Adaptación práctica del Real Decreto 175/2001 de 23 de febrero del laboratorio de una oficina de farmacia de la comunidad de Madrid. Madrid, Enero de 2002
9. A. I. Torres Suárez y M^a E. Gil Alegre. (2004) "Estabilidad de medicamentos. Requisitos de los estudios según la normativa actual". AEFI. Sección centro. Madrid.
10. Formulario Nacional. 1^a edición revisada y actualizada. Ministerio de Sanidad y Consumo. Madrid. 2007, p. 583-586.
11. Formulario Nacional. 1^a edición revisada y actualizada. Ministerio de Sanidad y Consumo. Madrid. 2007, p.535.

12. Formulario Nacional. 1ª edición revisada y actualizada. Ministerio de Sanidad y Consumo. Madrid. 2007, p.579.
13. Castaño M. T., Ruiz L. Y Vidal J.L. Monografías Farmacéuticas. 1ª Ed. Colegio Oficial de Farmacéuticos de la Provincia de Alicante. Alicante. 1998, p. 393-394.
14. Castaño M. T., Ruiz L. Y Vidal J.L. Monografías Farmacéuticas. 1ª Ed. Colegio Oficial de Farmacéuticos de la Provincia de Alicante. Alicante. 1998. 697-699.
15. Martindale. Guía completa de consulta farmacoterapéutica. Segunda edición. Pharma Editores, S.L. 2006. Barcelona. España, p. 1222.
16. Veron M.; Selles E.; Escalera B. Estabilidad del minoxidil en formulaciones magistrales de uso tópico. Ciencia Farmacéutica: Revista española del medicamento y del producto sanitario 1992; 2 (6): 411-414.
17. Llopis M. J., Baixauli V. La Formulació Magistral en la oficina de Farmacia. Ed. Distribuciones Cid. Valencia. 1990. Parte 3ª, p. 46.
18. Neth. Appl. 6, 615,385 (Upjohn Co.), 1967. CA: 68, 21947h.1968.
19. Zappacosta AR. Reversal of Blandness in a patient receiving minoxidil for hypertension. N. Eng. J. Med. 303: 1480-1481, 1980.
20. Moreno Giménez JC. Minoxidil: Quince años después, del 2% al 5%. Med Cutan Iber Lat Am 2006; 34(2):89-90.
21. Martindale. Guía completa de consulta farmacoterapéutica. Segunda edición. Pharma Editores, S.L. 2006. Barcelona. España, p. 1293.
22. Katz HI. Topical minoxidil: review of efficacy and safety. Cutis 1989; 43: 94-8.
23. Catálogo de especialidades farmacéuticas. Ed. 2010. Consejo General de Colegios de Farmacéuticos. Madrid. (2010), p. 136.
24. Klaus Florey. Analytical Profiles of Drug Substances. Vol. 17. Academic Press. Minoxidil. Pag. 187-219.

25. Clarke's isolation and identification of drugs in pharmaceuticals, body fluids and post-mortem material. 2^a ed. The Pharmaceutical Press. 1986. 786-787.
26. Regaine® solución. Ficha Técnica. Mcneil Consumer Healthcare S.L.U. Diciembre 1999.
27. Martindale. Guía completa de consulta farmacoterapéutica. Segunda edición. Pharma Editores, S.L. 2006. Barcelona. España, p. 1223.
28. Catálogo de especialidades farmacéuticas. Ed. 2010. Consejo General de Colegios de Farmacéuticos. Madrid. (2010), p.1188.
29. Ministerio de Sanidad y Consumo. Real Farmacopea Española 3^a edición. 2005. 2211 - 2212.
30. The United States Pharmacopeia, 21st revision—The National Formulary, 16th Ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, USA., Supplement 4, 1986 p. 2193.
31. The Merck Index, M. Windholz, Ed., 10th Edition, Merck and Co., Inc. Rahway, N.J., 1983, p. 889.
32. Real Decreto 175/2001, de 23 de Febrero, por el que se aprueban las normas de correcta elaboración y control de calidad de fórmulas magistrales y preparados oficinales. BOE, núm. 65, de 16 de marzo de 2001.
33. Ministerio de Sanidad y Consumo. Real Farmacopea Española 3^a edición. 2005, p. 171.
34. Monografías de AEFI. Validación de métodos analíticos. Barcelona, marzo de 2001. 46-47.
35. Avendaño C. Introducción a la química farmacéutica. 1^a Ed. Interamericana – McGraw-Hill. 1993. Madrid. España, p. 930.
36. International Conference on Harmonization (ICH), "Validation Of Analytical Procedures: Text and Metodology", ICH Harmonised Tripartite Guideline, ICH Q2(R1) (CPMP/ICH/381/95), Noviembre 2005.
37. A.E.F.I. Validación de métodos analíticos. Barcelona. Marzo 2001.

38. Douglas A. Skoog, F. James Holler, Stanley R. Crouch. Principios de análisis instrumental. 6ª Ed. Cengage Learning. 2008. Santa Fe. México, p. 816.
39. Monografías de AEFI. Validación de métodos analíticos. Barcelona, marzo de 2001, p. 119.
40. Formulario Nacional. 1ª edición revisada y actualizada. Ministerio de Sanidad y Consumo. Madrid. 2007, p.583.
41. Formulaire Therapeutique Magistral. 1ª Edition – Pharmaciens. 2003. 387-389.
42. Apotheker Zeitung 23/05/88, 4º, nº 21.
43. Salazar, R. “Estabilidad de Medicamentos”. Asociación española de farmacéuticos de industria (AEFI). Sección catalana. Barcelona. 1998, p. 177.
44. International Conference on Harmonization (ICH), “Stability Testing Of New Drug Substances And Products”, ICH Harmonised Tripartite Guideline, ICH Q1A(R2) (CPMP/ICH/2736/99), Marzo 2003.
45. Committee For Proprietary Medicinal Products. “Stability Testing Of Existing Active Substances And Related Finished Products.” CPMP/QWP/122/02; Junio 2003.
46. Salazar, R. “Estabilidad de Medicamentos”. Asociación española de farmacéuticos de industria (AEFI). Sección catalana. Barcelona. 1998. 15 – 16.
47. M. E. Aulton. La ciencia del diseño de las formas farmacéuticas. Ed. Elsevier. 2004, p 661.
48. Remington. Farmacia. 17 ed. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Vol. II, p. 1772. (1991).
49. Ministerio de Sanidad y Consumo. Real Farmacopea Española 1ª edición. 1997. 308.
50. De la Rosa Jorge, M.C. Calidad en la Industria Farmacéutica. Guía de Prácticas. Dpto. Microbiología. Facultad de Farmacia. UCM.
51. Formulario Nacional. 1ª edición. Ministerio de Sanidad y Consumo. Madrid. 2003, p.515.

-
52. Llopis MJ y Baixauli V: La formulación magistral en la oficina de farmacia. Ed. Distribuidores Cid . Valencia. 1981. Parte 1ª p. 54.
 53. Formulario Español de Farmacia Militar. 7ª edición. Ministerio de Defensa. 1999. Vol. II. p. 1328.
 54. Llopis MJ y Baixauli V: La formulación magistral en la oficina de farmacia. Ed. Distribuidores Cid. Valencia. 1985. Parte 2ª p. 167.
 55. Remington. Farmacia. 17 ed. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Vol. II, p. 1709. (1991).
 56. Ministerio de Sanidad y Consumo. Real Farmacopea Española 3ª edición. 2005. 2699.
 57. Castaño M. T., Ruiz L. Y Vidal J.L. Monografías Farmacéuticas. 1ª Ed. Colegio Oficial de Farmacéuticos de la Provincia de Alicante. Alicante. 1998, p. 318.
 58. Comisión de formulación magistral de MICOFV. Manual de información individualizada al paciente en formulación magistral. MICOFV. 2006, p. 80.
 59. Douglas A. Skoog, F. James Holler, Stanley R. Crouch. Principios de análisis instrumental. 6ª Ed. Cengage Learning. 2008. Santa Fe. México, p. 248.
 60. Monografías de AEFI. Validación de métodos analíticos. Barcelona, marzo de 2001, p. 49.
 61. Rojas García L.A. Tesis Doctoral. Evaluación de tres materiales de envase (vidrio, polietileno y polietilentereftalato) empleados para la toma de muestra para el análisis de mercurio en orina. Guatemala, Octubre de 2007.
 62. Herrera Ocheita J.M. Tesis Doctoral. Estudio comparativo de la estabilidad acelerada de soluciones para la terapia de rehidratación oral a base de dextrosa, en envases de vidrio y en envases de polietileno. Guatemala, Junio de 2001.
 63. Formulario Español de Farmacia Militar. 7ª edición. Ministerio de Defensa. 1999. Vol. II. p. 563.
 64. Umbert, P. y Lambí, F. La formulación en la dermatología del 2010. Acofarma.

-
65. Pharmacopée Francaise. Edición 10. Vol. 2. Ed. Ministère de la Santé Publique et de la Sécurité Sociale. París, 1991.
 66. Douglas A. Skoog, F. James Holler, Stanley R. Crouch. Principios de análisis instrumental. 6ª Ed. Cengage Learning. 2008. Santa Fe. México, p. 526.
 67. Douglas A. Skoog, F. James Holler, Stanley R. Crouch. Principios de análisis instrumental. 6ª Ed. Cengage Learning. 2008. Santa Fe. México, p. 455.
 68. Avendaño C. Introducción a la química farmacéutica. 1ª Ed. Interamericana – McGraw-Hill. 1993. Madrid. España, p. 941.
 69. Douglas A. Skoog, F. James Holler, Stanley R. Crouch. Principios de análisis instrumental. 6ª Ed. Cengage Learning. 2008. Santa Fe. México, p. 459.
 70. Charles J. Pouchart. The Aldrich Library of Infrared Spectra. Edition III. 1981.